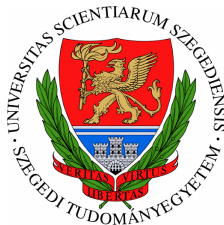


DOKTORI ÉRTEKEZÉS

***A DROSOPHILA MELANOGASTER 26S PROTEASZÓMA  
RPT1 ALEGYSÉGÉNEK MOLEKULÁRIS GENETIKAI  
ÉS FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA***

**SZABÓ ÁRON**



TÉMAVEZETŐ: Udvardy Andor, Ph.D., D. Sc.

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóintézete  
Biokémiai Intézet  
Intracelluláris fehérjelebontás csoport

SZEGED

2007

# TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	1
I. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
1. Előszó.....	4
2. Történeti bevezetés és az ubiquitin rendszer.....	5
3. Ubiquitin receptorok.....	9
4. A 20S proteaszóma.....	11
5. A 26S proteaszóma és a 19S regulátor komplex.....	14
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	29
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	30
1. Új allélok létrehozása P-elem remobilizációval.....	30
2. Az Rpt1/p48B mutáció fenotípusának menekítése az Rpt1 ektopikus expressziójával.....	30
3. Polimeráz láncreakció .....	31
4. Komplementációs teszt.....	33
5. Fehérjeminták preparálása.....	33
6. Kétdimenziós gélelektroforézis.....	34
7. Nyálmirigy óriáskromoszóma preparálás és immunfestés	34
8. Genetikai interakció.....	35
9. Neuroblaszt preparálás és citológiai jellemzés.....	35
IV. EREDMÉNYEK.....	36
I. Az Rpt1 gén genetikai jellemzése.....	36
II. Az <i>Rpt1</i> allélok molekuláris analízise .....	46
III. Az <i>Rpt1<sup>P1</sup></i> mutáció biokémiai következményei .....	52
IV. Az <i>Rpt1<sup>P1</sup></i> mutáns mitotikus jellemzői és genetikai interakciói .....	63
V. AZ EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA.....	65
VI. IRODALOMJEGYZÉK.....	77
VII. ÖSSZEFOGLALÓ.....	90
VIII. SUMMARY.....	94
IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	97
X. KÖZLEMÉNYEK.....	100

## Rövidítések jegyzéke

AAA	számos aktivitással asszociált ATPáz (ATPases associated with various activities)
AMP	adenozin 5'-monofoszfát (adenosine 5'-monophosphate)
APC/C	anafázis előremozdító komplex/cikloszóma (anaphase promoting complex/cyclosome)
APF-1	ATP függő proteolízis faktor-1 (ATP-dependent proteolysis factor-1)
ATP	adenozin 5'-trifoszfát (adenosine 5'-triphosphate)
ATPáz	adenozin 5'-trifoszfátáz
<i>Bc</i>	<i>black cells</i>
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS (complementer DNA)
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonio]-1-propánszulfonát hidrát ([[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate)
Cks1	ciklin dependens kináz alegység 1 (cyclin-dependent kinase subunit-1)
COP9	konstitutív fotomorfogenezis 9 (constitutive photomorfogenesis 9)
CRL	kullin-RING ligáz (cullin-RING ligase)
C-terminális	karboxiterminális (carboxy terminal)
<i>CyO</i>	<i>Curly Oster</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)
DNáz	dezoxiribonukleozidáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
DPE	3' promoter elem (downstream promoter element)
DTT	ditiotreitol
DUB	deubiquitináló enzim
E1	ubiquitin aktiváló enzim
E2	ubiquitin konjugáló enzim
E3	ubiquitin-protein ligáz
ECL	erősített kemilumineszcens technika (enhanced chemiluminescence technique)

EMS	etil-metán-szulfonát
G1/S	gap1/synthesis
G2/M	gap2/mitosis
GFP	zöld fluoresszcens fehérje (green fluorescent protein)
H2A	hiszton 2A
HECT	homológ az E6-AP C-terminálisával (homologue to E6-AP C-terminus)
<i>If</i>	<i>Irregular facets</i>
I $\kappa$ B $\alpha$	a $\kappa$ B $\alpha$ inhibitora (inhibitor of $\kappa$ B $\alpha$ )
Inr	iniciátor (initiator)
JAMM	Jab1/MPN domén-asszociált metalloizopeptidáz motívum
kb, kbp	kilobázispár
kDa	kilodalton
MDa	megadalton
MHC I	fő hisztokompatibilitási komplex I (major histocompatibility complex)
N-terminális	aminoterminális (amino terminal)
Ntn	N-terminális nukleofil
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAN	proteaszóma aktiváló nukleotidáz (proteasome-activating nukleotidase)
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PBST	PBS+1% Triton X-100
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
RING	really interesting new gene
RNáz	ribonukleozidáz
RNS	ribonukleinsav
Rpn	regulátor partikulum nem ATPáz (regulatory particle non-ATPase)
Rpt	regulátor partikulum AAA ATPáz (regulatory particle triple A ATPase)
RT-PCR	reverz transzkripció kapcsolt PCR (reverse transcription coupled PCR)
S2	Schneider 2
SCF	Skp1-cullin-F-box complex
<i>Sco</i>	<i>Scutoid</i>

SDS	nátrium-dodecíl-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
TCR	T-sejt receptor (T-cell receptor)
UBA	ubiquitin asszociált (ubiquitin associated)
Ubc	ubiquitin konjugáló enzim (ubiquitin conjugating enzyme)
UBL	ubiquitinszerű (ubiquitin-like)
Ub	ubiquitin
UIM	ubiquitin interakciós motívum (ubiquitin interaction motif)
UTR	nem transzlált régió (untranslated region)
WC	wing-clipped
<i>w</i>	<i>white</i>

# **Bevezetés**

## **Előszó**

A szabályozás, mint egy, a folyton változó környezethez történő alkalmazkodási forma, minden élő és élettelen rendszerben jelen van. Az élő szervezetek legprimitívebbike is számtalan, összeegyeztethetetlennek tűnő folyamatot koordinál a másodperc törtrésze alatt, míg az ezeknek a folyamatoknak a megértésére tett erőfeszítések több száz év után sem tudnak egy-egy "egyszerűbb" alrendszert ezen az élőlényen belül modellezni. A megértésre törekvés során szerzett tömördek ismeretnek egy morzsája csupán, amiről ebben a dolgozatban szó lesz, és ennek a területnek is apró töredéke, amellyel kapcsolatban kísérletes módon megfigyelt újdonságokról esik majd szó. Ennek ellenére a dolgozat témája, a 26S proteaszóma és az ubiquitin rendszer az eukarióta szervezetek nagy jelentőséggel bíró szabályozási elve. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagynunk a rokon területek által vizsgált jelenségek hozzájárulását a proteaszóma kutatásához és a leírt eredmények eléréséhez és értelmezéséhez.

## Történeti bevezetés és az ubiquitin rendszer

A transzkripció, transláció és a fehérjetermék közvetett vagy közvetlen visszacsatolása ahhoz a DNS szekvenciához, amely azt kódolja, egy fokozatosan megismert és sokáig egyeduralkodóan fontosnak vélt szabályozási kört jelentett a molekuláris biológia történetében. Bár a hetvenes évek közepére már sok arra utaló jel gyűlt össze, hogy vannak olyan folyamatok, amelyek az addig felismert szabályozási elvek alapján nem, vagy nehezen írhatók le, a főbb kutatási irány továbbra is a több elismerést kivívó, már valamennyire megismert transzkripciós szabályozási modellek felállítása maradt. Néhány kutató vállalkozott rá csupán, hogy bizonyos lényegtelennek tűnő jelenségek után nézzen, mint például a tirozin aminoszferáz lebontódása hepatóma sejtekben<sup>1</sup>. Ennek során kiderült például, hogy az enzim lebontásáért nem csak külső faktorok, mint például a közeg pH-ja, felelősek, hanem szükséges hozzá adenosin 5'-trifoszfát (ATP) is. Az ATP szintézisében részt vevő enzimek gátlásakor ugyanis nem következett be a tirozin aminoszferáz lebontása. Vagyis a tirozin aminoszferáz lebontása aktív, energiaigényes folyamat és ennek a felismerésnek óriási jelentősége volt.

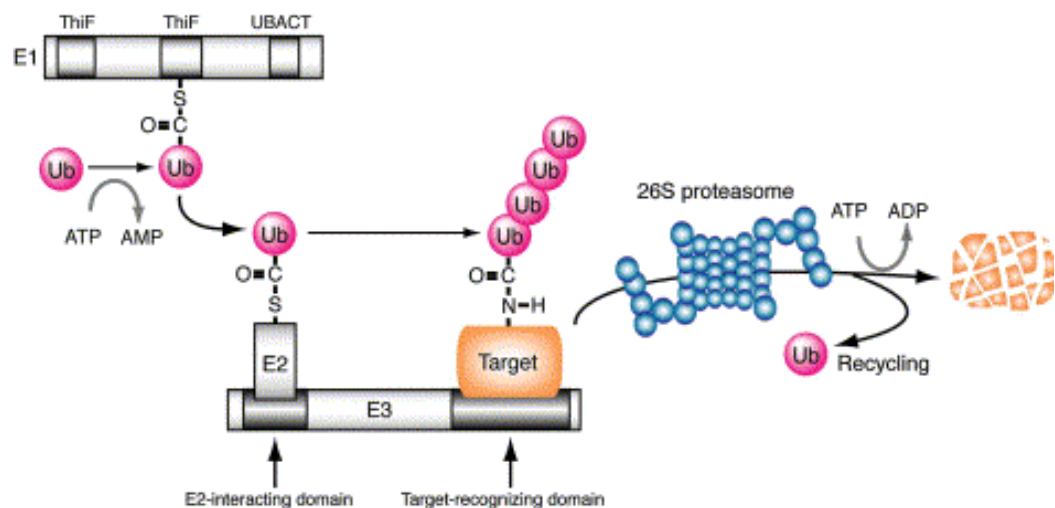
Más csoportok is arra az eredményre jutottak az 1970-es évek folyamán, hogy más fehérjék lebomlása is energiaigényes folyamat<sup>2</sup>. Egyre bizonyosabbá vált, hogy az intracelluláris fehérjék legalább egy részének a lebontásáért egy ATP-függő rendszer felel, amely biokémiai eszközökkel vizsgálható, így komponensei is izolálhatók jól jellemzett sejtmentes extraktumokból, mint a patkánymáj extraktum vagy az eritrocita és retikulocita lizátum. A fehérjebontási rendszer első tisztított komponense az ATP-függő proteolízis faktor-1 (APF-1) volt<sup>3,4,5</sup>, amelyről rövidesen kiderült, hogy azonos az egész eukarióta élővilágban előforduló ubiquitinnel<sup>6</sup>. Az ubiquitin egy 8 kDa-os, 76 aminosavból álló hőstabil polipeptid, amelynél a C-terminálison elhelyezkedő glicin meglete esszenciális a működéshez<sup>7,8</sup>. Ennek fontosságára csak a többi komponens izolálásával derült fény<sup>9</sup>. Az intracelluláris fehérjék egy vagy több, láncba rendeződő ubiquitinnel jelölődhetnek kovalens amidkötés révén, amelyet három enzim együtműködése helyez el ezen fehérjék lizinjeinek  $\epsilon$ -aminocsoportjain. Elsőként a H2A hiszton 119-es lizinjén fedezték fel az ubiquitin egy kópiájának jelenlétét, amely egy amidkötéssel kapcsolódott C-terminális 76-os glicinjének karboxics csoportján keresztül a lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjához<sup>10</sup>. Hershko és munkatársai több év munkájával a nyolcvanas évek fordulóján izolálták az APF-1-

et és azt a három különböző aktivitású enzimet<sup>9,11,12</sup>, amelyek mindegyikére szükség volt ahhoz, hogy az APF-1 (ubiquitin) kovalens kötést képezzen a modellként használt szubsztátfehérjével (lizozim, globin,  $\alpha$ -laktalbumin)<sup>13-16</sup>. A háromféle enzimet funkciójuk szerint ubiquitin aktiváló, ubiquitin konjugáló és ubiquitin-protein ligáz enzimnek nevezték el<sup>9</sup>. Felfedezték továbbá, hogy ATP utánpótlás nélkül a többszörösen ubiquitinnel konjugált szubsztátokon csökken a kötődött ubiquitinek száma, tehát valamilyen proteáz (amidáz) bontja az ubiquitin és a szubsztát közti kovalens kötést<sup>17,18</sup>. A proteázok ezen csoportja később a deubiquitináló enzim (DUB) gyűjtőnevet kapta. Az *in vivo* szubsztátok mibenlétére sokáig nem derült fény (kivéve a H2A-t), mígnem Goldberg és Boches felfedezték, hogy az oxidált, sérült szerkezetű fehérjék sokkal jobban bontódnak ATP-függő proteolízissel, vagyis ezek jobb szubsztátjai az ubiquitináló enzimeknek<sup>19</sup>. Elég sokáig nem is kerestek másféle szubsztátokat, és az ubiquitinációt a sejt „takarító” mechanizmusának tartották. Miután az aktív fehérjebontás alapmechanizmusát tisztázták, a folyamat biokémiai részletei kerültek a vizsgálódások középpontjába<sup>20,21,24,25</sup>.

Az ubiquitin aktiváló enzim vagy E1 általában egyféle polipeptidként van jelen minden fajban, néhány kivétellel, mint például az emlősök, amelyeknél két transzlációs iniciációs hely felhasználásával két, különböző hosszúságú polipeptid keletkezik. Az ubiquitin rendszer genetikai elemzése egy E1-et érintő hőmérséklet érzékeny mutáció izolálásával kezdődött egy emlős sejtvonalban, amelynek restriktív hőmérsékleten történő inkubálása során kiderült, hogy a sejtciklus folytonosságához nélkülözhetetlen az ubiquitinációs enzimaszkád, és a mutáns sejtekben számos rövid életidejű fehérje halmozódik fel<sup>26,27</sup>.

Az E1 enzim a szabad ubiquitin aktiválását végzi ATP-függő módon, először  $Mg^{2+}$ -ATP-t, majd ubiquitint köt első reakciócentrumában, így egy ubiquitin-adenilát képződik. A második reakciócentrum szulfhidrilcsoportja a második reakcióban megtámadja az ubiquitin-adenilátot és így ubiquitin-tiolészter keletkezik egy AMP kihasadásával. Minden teljesen töltött E1 ezek szerint két ubiquitint hordoz, egyet adenilátként és egyet tiolészterként. Az ubiquitin karboxiterminális glicinje esszenciális a reakciók végbemeneteléhez, mivel ezzel képződik mindkét termék. A végül keletkező E1-ubiquitin tiolészter az ubiquitin konjugáló (E2) enzimek aktív ciszteinjének hatására bomlik fel, vagyis egy E2-ubiquitin tiolészter és E1 enzim keletkezik (transzészterifikációs reakció)<sup>21</sup> (1. ábra).





### 1. ábra Az ubiquitin rendszer

Jelmagyarázat: Ub-ubiquitin (lila kör), E1-ubiquitin aktiváló enzim, E2-ubiquitin konjugáló enzim, E3-ubiquitin-protein ligáz, target-szubsztrát (narancssárga)

Az ábra S. Hatakeyama és K.I. Nakayama cikkéből származik (Biochem Biophys Res Commun. 2003 Mar 21;302(4):635-45.).

Az ubiquitin konjugáló enzimek (Ubc-k) egy, az E1-nél népesebb csoportot alkotnak, a sarjadzó élesztőben tizenhárom E2 vagy E2 rokon fehérje található. Az összes E2-ben van egy közös belső domén (UBC), amely körülbelül 150 aminosav hosszú, és egy konzervált ciszteint foglal magába. Ez a cisztein fogadja az E1-ről érkező aktivált ubiquitint (1. ábra). Az UBC doménen kívüli fehérjestruktúrák jelenthetik az E3 enzimekhez való specifikus csatlakozás lehetőségét. Egy E2 számos E3-mal kölcsönhathat, és az egyes E3-ak is számos E2-vel, mégis az *in vivo* adatok egyre inkább preferált, specifikus E2-E3 párokat valószínűsítene<sup>21</sup>.

Az E3, vagy ubiquitin-protein ligáz enzimek az ubiquitinnal töltött E2-k és a specifikus szubsztrátok megkötésére alakultak ki, ezzel egyfajta összerendezési felületet biztosítva a szubsztrát ubiquitinációjához (1. ábra). Az E3 biztosítja az ubiquitin konjugáló enzimeknek a lehetőséget, hogy a szubsztrát valamely lizinjének  $\epsilon$ -aminocsoportjára izopeptid kötéssel elhelyezzék az ubiquitin C-terminális glicinjét, illetve a kovalensen kötött ubiquitinhez további ubiquitineket csatlakoztassanak láncszerűen, az ubiquitin 7 belső lizinjének valamelyikét (K6, K11, K27, K29, K33, K48 és K63) tovább ubiquitinálva. Az E3-ak ma már három csoportba sorolhatók jellemző doménjeik alapján<sup>21</sup>.

Az első jellemzett E3 család tagjai HECT domént hordoznak. A család egyik tagja, az E6-AP egy celluláris fehérje. Partnerét, az E6-ot a humán papilloma vírus genomja kódolja, és a két fehérje komplexe képes a p53 ubiquitinációjára. Az E6-AP C-terminális 350 aminosava nagyfokú homológiát mutatott számos, máskülönben nem rokon fehérje szekvenciájával. Számos ilyen HECT domén fehérjénél, köztük az E6-AP-nél is egy, a C-terminálistól 35 aminosavra elhelyezkedő cisztein adja az aktív centrumot, ahova az E2-ről az ubiquitin átészterifikálódhat. A HECT aktív ciszteinről kerül a szubsztrátra az ubiquitin<sup>21</sup>. Minden más E3 családban hiányzik az ilyen funkciójú cisztein, azok a ligázok nem kötnek ubiquitint.

A második, eddig legnépesebb család a RING finger fehérjéké. A RING egy speciális cink finger, 40-100 aminosav hosszú és nyolc konzervált pozíciójú ciszteint és hisztidint tartalmaz, amelyek négyesével 1-1  $Zn^{2+}$ -t koordinálnak. A RING finger funkciója akkor vált ismertté, mikor az Rbx1/ Roc1/ Hrt1 RING fehérjéről kiderült, hogy szükséges a négy alegységből felépülő SCF ubiquitin ligáz működéséhez. Ezután egy *in vitro* kísérletben felfedezték, hogy a kipróbált RING finger fehérjék rendelkeznek ubiquitin ligáz aktivitással. Az aktivitás függ a cink-koordináló aminosavak meglététől. Vannak azonban olyan RING finger fehérjék is, amelyek *in vitro* nem mutatnak ligáz aktivitást, sem más funkciót az ubiquitin rendszerben. Ezeknek a szerepéről nem sokat tudunk. Az ubiquitin ligázokban jelenlevő RING finger az E3 és az E2 között fehérje-fehérje kölcsönhatásokat hoz létre<sup>21</sup>.

Az E3 funkció ellátásáért sokszor nem csupán egy polipeptid, hanem egy egész komplex felel. Ma két fő csoportba sorolhatók a többalegységes, RING motívumot tartalmazó E3-ak. Az első csoport tagjai a kullin-RING ligázok (CRL-ek)<sup>22</sup>, míg a másodikba az anafázis előremozdító komplex/cikloszóma (APC/C)<sup>23</sup> tartozik. A kullinok mindegyike képes különböző szubsztrátokat ubiquitináló komplexeket létrehozni (Cul1, 2, 3, 4, 5, 7), míg az APC esetében nem egy kullin homológ alegység (Apc2), hanem egy másik alegység (Apc1) rendezi össze vázként a többi alegységet<sup>144</sup>. Ezek a többalegységes enzimek mindig tartalmaznak egy RING finger fehérjét, amely a katalízisért felel (Rbx1/Roc1/Hrt1 a kullin alapú ligázoknál, Apc11 az APC-nél). A szubsztrátok felismerése is külön erre specializált fehérjékkel történik, a kullin alapúaknál minden kullinhoz más és más családja tartozik a szubsztrátfelismerő fehérjéknek, míg az APC esetén három fő, tranziensen kapcsolódó protein végzi a szubsztrátok szelektálását (Cdc20/fizzy, Cdh1/fizzy-related és Ama1).

Az SCF (Skp1-cullin-F-box) komplex a CRL-ek csoportjába tartozik. Ez az E3 felelős leginkább a sejtciklus G1/S fázisában lezajló ubiquitinációs eseményekért.

Az első ubiquitin izopeptid kötésének kialakulása után a lánc következő tagjai az ubiquitin különböző belső lizinjeire kapcsolódhatnak, de általában a lánc teljes hosszában azonos lizinen keresztül kapcsolódnak az ubiquitinek. A három leggyakoribb kapcsolódás a 29-es, a 48-as és a 63-as lizinen keresztül történik<sup>21</sup>. A legutóbbi időkig a 48-as lizinen keresztkötött multiubiquitin lánc, ennek is a 4 fölötti tagszámú formája volt az, amelyet a proteaszóma által felismert degradációs jelnek véltek. Ennek ellentmond egy közlemény<sup>28</sup>, amely az APC/C által szintetizált multiubiquitinált ciklinB heterogén ubiquitináltságát mutatja be és ezeknek a formáknak a proteaszómális degradációját vizsgálva arra jut, hogy nem csupán a 48-as lizinen keresztkötött lánc funkcionál degradációs jelként, de a 29-esen és a 63-ason keresztkötött is.

## Ubiquitin receptorok

Ma már sokat tudunk az ubiquitináció szerepéről a különböző sejtszintű folyamatokban. Az egyik domináns és nagy jelentőséggel bíró folyamat, amelyben az ubiquitin szerepet játszik, a 26S proteaszóma általi fehérjelebontás. Sokáig kérdéses volt, hogy milyen módon ismeri fel a proteaszóma (és annak melyik része) a multiubiquitinált fehérjéket. Ezért keltett nagy figyelmet, mikor felfedezték az első proteaszóma alegységet, az Rpn10/S5a/p54-t, amely *in vitro* multiubiquitin láncokat tudott kötni<sup>29</sup>. Erről a proteaszóma kapcsán esik majd szó. A multiubiquitinált fehérjék azonban nem csak az S5a-n keresztül kötődhetnek a proteaszómához. Az ezredforduló tájékán kezdtek azokra a fehérjékre felfigyelni, amelyeknek az ubiquitin szekvenciájához és szerkezetéhez nagyon hasonló doménjük van, ez az UBL (ubiquitin-like) domén<sup>30</sup>. Ezeknek a fehérjéknek a legtöbbször ezen a doménen kívül található egy vagy két másik, jól jellemzett UBA (ubiquitin associated) domén, mely a multiubiquitinált fehérjék felismerését végzi<sup>31</sup>. Az ilyen fehérjék az emlősökben az S5a-hoz kötődnek az UBL-en keresztül<sup>32</sup>. Sarjadzó élesztőben, ahol az Rpn10 (az élesztő S5a ortológja) valamivel rövidebb, az UBL-UBA fehérjék egy nagy, strukturális szerepű proteaszóma alegységen, az Rpn1-en dokkolnak szintén az UBL révén<sup>33,34</sup>. Sarjadzó élesztőben három olyan UBL-UBA fehérje van, amelynek szerepe

lehet az ubiquitin-proteaszóma útban: a Rad23, a Dsk2 és a Ddi1<sup>35</sup>. Ezeknél az UBL az N-terminálison, az UBA-k a C-terminálison helyezkednek el. A Rad23 a legjobban jellemzett minden UBL-UBA fehérje közül. Ezt a proteint először a nukleotid kivágódással járó DNS javítási útban írták le<sup>36</sup>. Részletesebb vizsgálatok kiderült, hogy UBL domént hordoz, amely nélkülözhetetlen a DNS javító funkcióhoz, helyettesíthető az ubiquitin szekvenciájával és nem mediálja a Rad23 proteaszóma általi lebontását<sup>37</sup>. Felfedezték, hogy a Rad4 multiubiquitinálva köt a Rad23-hoz, amely a proteaszómához lebontásra szállítja, így takarítva el a reparáció után szükségtelenné vált komplexet<sup>38</sup>. A Rad23 és Rpn10 szerepének genetikai feltárása<sup>39</sup> során kiderült, hogy az  $\Delta Rpn10$  és  $\Delta Rad23$  deléciók, amelyeknek egyenként alig van megfigyelhető fenotípusa, a  $\Delta Rpn10\Delta Rad23$  kettős mutáns törzsben lassú növekedést, hidegérzékenységet és G2/M-beli sejtcikluskésést okoznak. A kettős mutáns sejtekben felhalmozódnak a multiubiquitinált fehérjék és specifikus szubsztrátok is. Más gének deléciói és fehérjetúltermeltetések segítségével bizonyították az UBL-UBA és Rpn10 fehérjék átfedő, multiubiquitin lánc szállító szerepét<sup>40,41,33</sup>. Végül *in vitro* és *in vivo*, valódi multiubiquitinált szubsztrátokkal és teljesen tisztított komponensekkel történt kísérletekből kiderült, hogy a Rad23 és az Rpn10 ugyanannak a szubsztrátnak a lebontásához milyen mértékben járul hozzá<sup>42,43</sup>. Azonban nem kizárólag az Rpn10 lehet képes a proteaszómán belül multiubiquitin láncot kötni. Egy fotoaktivált keresztkötéses kísérletben feltűnő erősséggel kötött egy jelölt multiubiquitin láncot az egyik regulátor komplex ATPáz alegység, név szerint S6'/Rpt5<sup>44</sup>. Egyes elgondolások szerint az S6'/Rpt5 az Rpn10 és az UBL-UBA receptorok után, a lebontási folyamat következő lépésében működik, vagyis a multiubiquitinált fehérje az Rpn10-ről vagy egy UBL-UBA fehérjéről kerül az S6'/Rpt5-re.

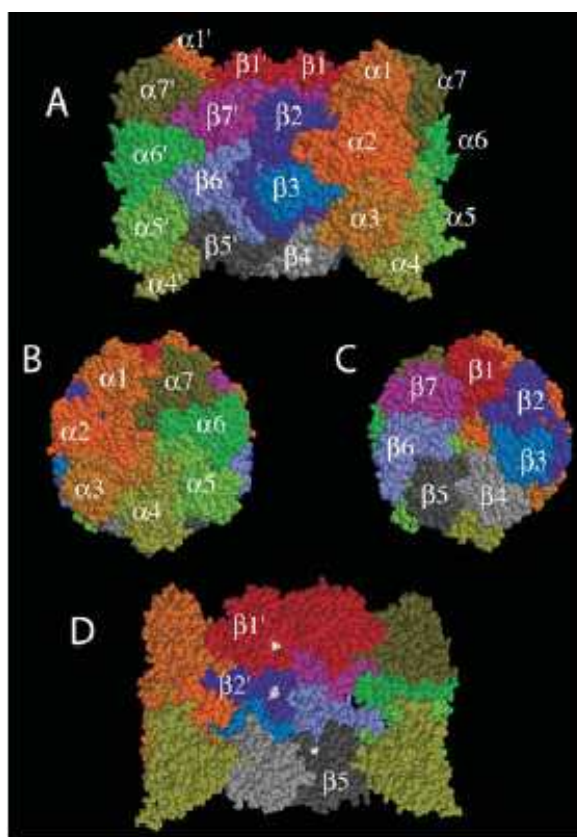
## A 20S proteaszóma

A proteaszómakutatás története egészen 1968-ig nyúlik vissza. Ekkor figyeltek meg először humán eritrocita lizátumok elektronmikroszkópos képén cylinder alakú struktúrákat, melyeket cylindrinnek neveztek el<sup>45</sup>. A cylindrin funkciójáról semmit sem tudtak és sokáig nem is hozták összefüggésbe a proteolízissel. Később egy rokon felépítésű, nagy molekulásúlyú multikatalitikus proteinázt tisztítottak patkánymájából<sup>45</sup>.

Egy más jellegű kutatási sorozatból kiderült, hogy egy proszómának vagy 19S ribonukleoproteinnek nevezett komplex van jelen az eukariótákban<sup>45</sup>. Ez a komplex hasonló volt a multikatalitikus proteinázhoz, de RNS-hez asszociálódva találták meg, és a génexpresszió regulációjában tulajdonítottak neki szerepet. 1988-ban azonban felfedezték, hogy a multikatalitikus proteináz és a proszóma ugyanaz a részecske. 20S proteaszómának nevezték el a komplexet, amely egyszerre utalt proteolitikus tulajdonságára és komplex felépítésére<sup>45</sup>. Kezdetben úgy gondolták, hogy a proteaszóma csak eukarióta sejtekben van jelen, de 1989-ben egy *Archaeobacterium*ból, a *Thermoplasma acidophilum*-ból olyan proteáz komplexet tisztítottak, amelynek szerkezete hasonlított a 20S proteaszómáéhoz és kimotriptikus aktivitása volt<sup>46</sup>. Ma már egyértelmű, hogy az Archaeák rendelkeznek 20S proteaszómával. Később megtalálták az első eubakteriális proteaszómát is a *Rhodococcus erythropolis*-ban<sup>47</sup>. Az eukariótákkal ellentétben a prokariótákban azonban a proteaszóma nem életfontosságú, a *Thermoplasma*-ban csupán a magas hőmérséklet tűrésében játszik szerepet. Más proteolitikus rendszerek helyettesíthetik a proteaszómát ezekben az élőlényekben<sup>45</sup>.

A 20S proteaszómát mind pro-, mind eukariótákban 28 alegység alkotja, de ezek komplexitása különböző. A prokariótákban általában két rokon, de különböző gén kódolta polipeptid ( $\alpha$  és  $\beta$ ) 14-14 kópiája alkotja a komplexet, míg eukariótákban 7 különböző  $\alpha$  és 7 különböző  $\beta$  alegységet kódoló gén található, amelyek termékeiből 2-2 fehérjekópia épül a szerkezetbe. Ennek ellenére a proteaszóma általános szerkezeti felépítése ugyanaz (2. ábra): a hordó alakú 20S formát 4 darab, egymás felett elhelyezkedő, 7-7 polipeptidből álló gyűrű alkotja, a hordó belsejében a  $\beta$ , a hordó szélén az  $\alpha$  alegységekkel. Általánosan a homooligomerek sorrendje prokariótákban a következő:  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ , míg az eukariótákban a különböző alegységek

heterooligomerjei  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  formációban figyelhetők meg. Eukariótákban a 14 különböző proteaszóma alegységből csak három  $\beta$  típusú aktív katalitikusan. Az emlősökben a  $\gamma$ -interferon kezelés stimulálja három további, indukálható  $\beta$  alegységnek ( $\beta_i$ ) nevezett fehérje expresszióját, amelyek mindegyike egy közeli rokon aktív  $\beta$  alegységet fog helyettesíteni a komplexben, amely szerkezetet az immunoproteaszóma nevet kapta. Ezek a speciális proteaszómák akkora szakaszokra hasítják az antigén fehérjét, hogy a darabok az antigén prezentációkor beleférjenek az MHC I típusú molekulák zsebébe<sup>45</sup>.



## **2. ábra A *Saccharomyces cerevisiae* 20S proteaszóma**

**A.** oldalnézetből, **B.** Az  $\alpha$ -gyűrűk felől, **C.** a fél proteaszómában a  $\beta$ -gyűrűk felől, **D.** a katalitikusan aktív  $\beta$ -alegységek helyzete oldalnézetből, feltárva a központi katalitikus kamrát.

Az ábra M. Bajorek és M. H. Glickman cikkéből származik (Cell Mol Life Sci. 2004 Jul;61(13):1579-88.).

Elektronmikroszkópos képeken a vizsgált élőlények 20S proteaszómája nagyon hasonló, hordószerű szerkezetet mutat (2. ábra), amely 15 nm hosszú, 11 nm átmérőjű és C2 szimmetriája van (a központ körüli kettős szimmetria). Röntgenkristallográfiával megfigyelhető három kamra a hordóforma belsejében, két külső és egy, a  $\beta$  alegységek által formált központi üreg, amelyeket vékony csatorna köt össze egymással és a két külsőt a külvilággal a hordó alapján keresztül. Az  $\alpha$ -alegységek N-terminális részei elzárják a centrális csatorna nyílását a külvilág felé. A központi üregben történik a voltaképpen proteolízis. A proteaszóma az N-terminális nukleofil (Ntn) hidroláz szupercsaládba tartozik. A  $\beta$  alegységeknél az N-terminális Thr-1 aminosav  $\gamma$  oxigénje a nukleofil abban a katalitikus támadásban, amely a szubsztát peptidkötés karbonil szénatomja ellen irányul. Valószínűleg egy vízmolekula és a treonin N-terminális aminocsoportja az, amely a Thr hidroxilcsoportját deprotonálja a nukleofil támadás előtt. A hasítható szubsztátok P1 aminosava, amely N-terminálisra található a hasítandó peptidkötéstől, lehet hidrofób, aromás, bázikus vagy glutamát, tehát a proteaszóma kimotripszin- ( $\beta 5$  alegység) és tripszinszerű ( $\beta 2$  alegység) és peptidilglutamil peptid hidrolizáló ( $\beta 1$  alegység) aktivitást mutat. Mindhárom aktivitás más  $\beta$  alegységhez köthető. A szubsztátfehérjéket a proteaszóma processzív módon dolgozza fel, vagyis nem szabadulnak ki lebontási intermedierek. Valószínűleg a központi kamra csapdába ejti a részlegesen vágott termékeket, amíg egy bizonyos méret alá nem csökkennek. Ez a méret a 4-től 25 aminosavas peptidekig terjed, átlagban 7-9 aminosav<sup>45</sup>.

A proteaszóma mind citoplazmatikusan, mind a sejtmagban előfordulhat<sup>48</sup>. Feltehetőleg klasszikus nukleáris lokalizációs szignálok irányítják a proteaszóma összeszerelődés intermediereit a karyopherin  $\alpha$ -án keresztül a magba<sup>49,50</sup>.

## A 26S proteaszóma és a 19S regulátor komplex

### Aktivátor komplexek

A 20S proteaszóma proteolitikus funkciója önmagában nem érvényesülhet, mert az  $\alpha$  alegységek N-terminális nyúlványai elzárják a centrális csatorna bejáratát a komplex mindkét végén. Mai ismereteink szerint az eukariótákban több módja is van annak, hogy a szubsztrátfehérje a 20S komplexbe bejuthasson és ott lebontódjon. Különböző aktivátor komplexek kapcsolódhatnak a 20S komplex egyik vagy mindkét végéhez, ezáltal segítve elő a szubsztrátok degradációját. Jelenleg négy aktivátor komplex ismert: a 19S regulátor vagy PA700, a 11S/PA28/REG, a PA200 és az Ecm29<sup>52,53</sup>. Egy vagy két darab 19S komplex asszociálódhat a 20S komplexhez, így létrehozva a 26S proteaszómát. A 26S proteaszóma kialakulása csak ATP jelenlétében történik meg, ATP elvonás hatására a két komplex disszociál. A 19S regulátor komplex felismeri a multiubiquitinált fehérjéket, míg a PA28 és a PA200 nem.

A PA28 család többsejtű eukariótákban fordul elő, hét alegysége homo- vagy heterooligomer komplexet alkot. Három PA28 homológ létezik<sup>52,45</sup>,  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$ . Az  $\alpha$  és  $\beta$  egymással heteroheptamert, a  $\gamma$  homoheptamert alkot. A PA28 $\alpha\beta$  feltehetőleg az immunrendszer része, mivel ez a komplex elősegíti az antigén processzálást és az MHC I osztályú fehérjéken való prezentációt. A PA28 $\alpha\beta$  aktivátor kötődése kinyitja a lezárt 20S csatornát úgy, hogy az egybeesik a regulátor csatornájával. A PA28 $\gamma$ -ról még kevesebb információ áll rendelkezésre. Tudjuk, hogy a PA28 $\gamma$  mutáns transzgénikus egerek lassabban fejlődnek és kisebbek, kevésbé viselik jól a fertőzéseket. A PA28 $\gamma$  mutáns fibroblasztokban több a sejtciklus G1 fázisában rekedt sejt és az apoptózis háromszor gyakoribb. A PA28 $\gamma$ -val kölcsönható fehérjék szinte mind kapcsolódnak az apoptózishoz. Ezen tulajdonságok alapján feltételezhető, hogy a PA28 $\gamma$  egy antiapoptotikus faktor.

A PA200-zal (BLM3 illetve 10) kapcsolatos kevés adat meglehetősen ellentmondásos<sup>52</sup>. A PA200 egyetlen, 200 kDa-os polipeptid, amely általánosan előfordul az eukariótákban. Képes a 20S két végéhez kapcsolódni és az axiális csatornát felnyitni, pontos szerepe azonban még nem tisztázott. Eredetileg a DNS javításban fedezték fel funkcióját, de mára már ez a szerepe kétségessé vált. Legújabb



eredmények szerint egerekben nem szükséges a DNS kettős szálú törésének javításához, de fontos szerepe van a hím gaméták keletkezésében<sup>54</sup>.

Érdekes módon mindhárom, nem 19S aktivátor aminosavszekvenciája szinte teljes egészében HEAT ismétlődésekből áll. Ezek az ismétlődések kb. 50 aminosavnyi  $\alpha$ -helikális domének, amelyek tandem módon összerendeződhetnek és két hélixenként szuperhélixet alkothatnak, egyfajta szolenoid vagy kupolaszerű struktúrát, amely nagy flexibilitást mutat<sup>53</sup>.

A PA28, a PA200 és az Ecm29 regulátorok jóval kevésbé ismertek, mint a 19S, de szerepük nem elhanyagolható a sejt fiziológiájában.

### A 19S regulátor komplex

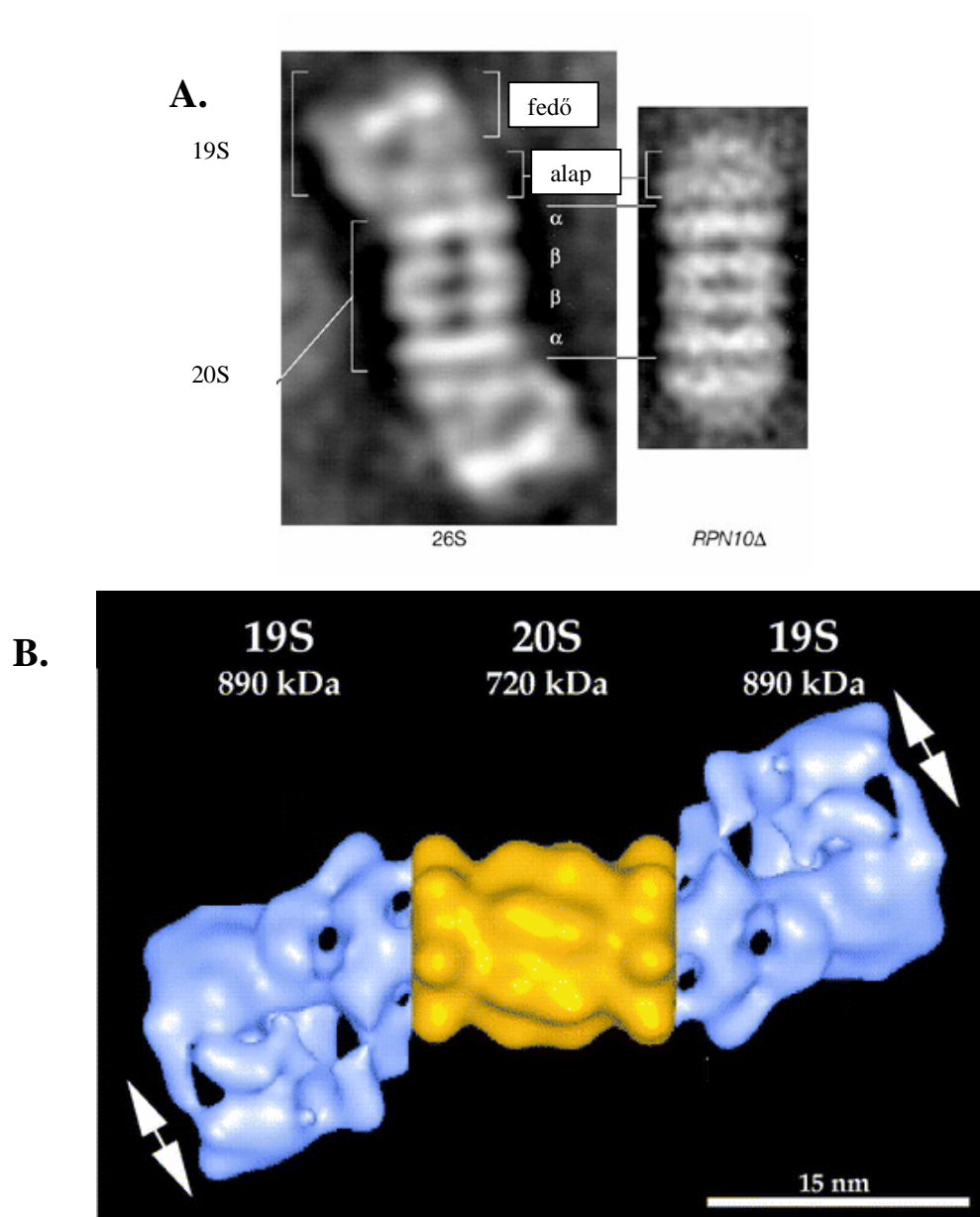
Joseph D. Etlinger és Alfred L. Goldberg 1977-ben felfedeztek nyúl retikulocita lizátumban egy olyan nem lizoszómális proteolitikus rendszert, amely ATP hatására stimulálódott<sup>55</sup>. Ez a rendszer képes volt az abnormális konformációjú fehérjék lebontására. A lizátum frakcionálásával Hershko és munkatársai a korábbiakban már említett módon felfedezték az ubiquitint és a három különböző ubiquitináló enzimet. De a proteázt, amely a multiubiquitinált fehérjéket bontotta, még nem találták meg. 1986-ban Hough, Pratt és Martin Rechsteiner multiubiquitinált fehérjék lebontására tesztelt különbözőképpen tisztított retikulocita frakciókat<sup>56</sup>. DEAE kromatográfia és glicerín gradiens centrifugálás után egy ATP függő proteázt találtak, amely 600 kDa-nál nagyobb tömegű volt. Az enzim csak ubiquitinált fehérjéket bontott és ez megmagyarázta a korábban tapasztalt második ATP függő lépés jelenlétét a lebontási folyamatban az ubiquitin aktivációja mellett. Egy évre rá ezt a frakciót sikerült szétbontani egy 1 MDa-os 26S proteaszómára és egy 700 kDa-os 20S proteaszómára<sup>57</sup>. A 20S komplex a multikatalitikus proteinázzal azonosnak bizonyult. A 20S proteaszóma nem volt ATP által aktiválható, míg a 26S komplex igen. Ugyanerre a következtetésre jutott ebben az évben Goldberg munkacsoportja is<sup>58</sup>. Hershko és munkatársai a következő években felderítették ezeknek a proteázoknak a fő sajátosságait<sup>59-61</sup>. Felfedezték, hogy különböző fehérjefaktorokból ATP hatására összeszerelődik az 1000 kDa fölötti nagyságú 26S proteáz. Ezen faktorok közül az egyik a 20S proteáznak bizonyult, amelyet így a 26S proteaszóma katalitikus magjaként ismertek fel Hershko és Goldberg csoportjai<sup>60,62</sup>. A másik

faktort Rechsteinerék találták meg, amely ATP és 20S jelenlétében teljes 26S proteasómát alkotott<sup>63</sup>, és amelynek alegységei mind megtalálhatók voltak a 26S proteasómában. Udvardy Andor tisztította homogenitásig *Drosophila*-ból ezt a regulátort, melyet  $\mu$  partikulumnak nevezett el<sup>64</sup>. Ez a partikulum olyan sztöchiometrikus komplexet alkotott a 20S komplexszel, mely megfelelt a 26S proteasómának. Független kutatások is megtalálták ezt a regulátor partikulumot, és a felfedezők PA700-nak és 19S sapka komplexnek nevezték el<sup>65,66</sup>.

Elektronmikroszkópos képen a 19S regulátor a 20S egyik vagy mindkét végén különálló sapkát alkot (3. ábra). Több *in vitro* adat mutatja, hogy a 20S egyik végén 19S regulátort, másik végén PA28-at kötve hibrid proteasómákat képes létrehozni<sup>45</sup>. Ezek funkciójáról és *in vivo* előfordulásáról még keveset tudunk.

Mai tudásunk szerint eukariótákban a multiubiquitinált fehérjék degradációjára csupán a 26S proteasóma képes. A sejt fehérjéinek 80-90%-a kerül lebontásra ilyen módon. A 26S komplex kb. 45 nm hosszú, 20 nm széles és 2,5 MDa tömegű. Egy és kétsapkás proteasómák is előfordulnak, a köztük levő esetleges biokémiai különbség ma még nem ismert. A 19S sapkák flexibilisen kapcsolódnak a 20S-hez és két sapka esetén nagyjából középpontos szimmetriát mutatnak a 20S komplex központjára (3. ábra). ATP elvonás hatására a 26S komplex alkotóelemeire, a 20S és 19S komplexekre esik szét, amelyekből ATP hozzáadása után újra összeszerelődik. A 19S komplex számos tulajdonságot kölcsönöz a teljes komplexnek, amivel a 20S önmagában nem rendelkezik:

1. szelektíven felismeri és megköti azokat a fehérjéket, amelyek megjelölve lebontásra kerülnek (javarészt multiubiquitinált fehérjék)
2. kitekeri a megkötött fehérjéket
3. a kovalensen kötött ubiquitin láncot levágja a szubsztrátról
4. a 20S  $\alpha$  alegységek végei által alkotott kaput felnyitja a 20S nyílásában, így az befogadhatja a szubsztrátot
5. a kitekért szubsztrátot a 20S üregébe juttatja, hogy elindulhasson a lebontás.



**3. ábra A *Saccharomyces cerevisiae* 26S proteaszóma**

**A.** A 26S proteaszóma és az *Rpn10 $\Delta$*  proteaszóma elektronmikroszkópos képe. Az *Rpn10 $\Delta$*  proteaszóma csak az alapot és a 20S proteaszómát tartalmazza, a fedőt nem.

**B.** A 26S proteaszóma elektronmikroszkópos képe alapján készült modell. Kékkel jelzett a 19S regulátor komplex, sárgával a 20S komplex. Az ábrák D. Voges és mtsai. (Annu Rev Biochem. 1999;68:1015-68.) és M. H. Glickman és mtsai. (Cell. 1998 Sep 4;94(5):615-23.) cikkeiből származnak.

Habár a 19S regulátor komplex felismeri a multiubiquitinált fehérjéket, nem kizárólag azokat képes kötni. Vannak olyan esetek, mikor a fehérje szerkezete lehetővé teszi, hogy a multiubiquitináció nélkül kötődjön a 26S proteasómán és degradálódjon<sup>51</sup>. Ennek egyik példája az ornitin dekarboxiláz lebontása. Ez a fehérje ubiquitináció nélkül is bontódik a proteasómában, mivel C-terminális része ubiquitinszerű feltekeredést mutat és így a 19S regulátor komplex felismeri. Az antizyme az ornitin dekarboxilázhoz kapcsolódó inhibitor, amely nyolcszorosára növeli annak proteasómához való affinitását<sup>51</sup>. A timidilát szintáz nem strukturált szerkezetű N-terminális 6 aminosava szintén degradációs jel, amelyet a 19S regulátor felismer és ezáltal lebontja a fehérjét<sup>51</sup>. Vannak továbbá olyan fehérjék, amelyek multiubiquitinálódhatnak, de ubiquitinálás nélkül is degradálódnak a 26S proteasómában. Ilyen például a p21/Cip1, a TCR  $\alpha$  alegysége, az I $\kappa$ B $\alpha$ , a c-Jun és a kalmodulin<sup>51</sup>. Ezen fehérjék ubiquitin független lebontásáról még nem sokat tudnak.

A 19S komplex élesztőben, ahol eddig a legalaposabban vizsgálták, legalább 19 különböző alegységből áll (4. ábra, I. táblázat). Ez a szám rendszertani csoportok szerint változhat. Vannak csupán fajra jellemző egyedi alegységek is, mint az élesztő RPN4, az emberi S15 és a *Drosophila* és emberspecifikus p37A (I. táblázat). A nevezéktan eltér a sarjadzó élesztő, a hasadó élesztő, a *Drosophila*, a növények és az ember esetében, ezért meglehetősen nehéz a kiigazodás a homológ alegységeket keresve, bár az utóbbi években a sarjadzó élesztő nevezéktan kiszorítani látszik az összes többi<sup>67</sup>. Az emberi alegységek nevei S-sel, az sarjadzó élesztő fehérjék Rp-vel kezdődnek, Rpt (regulatory particle triple A ATPase) és Rpn (regulatory particle non-ATPase) az ATPáz és nem ATPáz alegységekre. A *Drosophila* megfelelőket molekulatömeg szerint, p kezdőbetűvel számozzák (p110, p97, stb.).

<u><i>Drosophila</i></u>	<u><i>H. sapiens</i></u>	<u><i>S. cerevisiae</i></u>
p110	S1	Rpn 2
p97	S2	Rpn 1
p58	S3	Rpn 3
p56	S4	Rpt 2
p55	S5b	Rpn 5
p54	S5a	Rpn 10
p50	S6'	Rpt 5
p48A	S6	Rpt 3
p48B	S7	Rpt 1
p42A	S10	Rpn 7
p42B	S9	Rpn 6
p42C	S8	Rpt 6
p42D	S10b	Rpt 4
p39A	S11	Rpn 9
p39B	S12	Rpn 8
p37A	UCH37	-
p37B	S13	Rpn 11
p30	S14	Rpn12
-	ADRM1	Rpn13
-	-	RPN4

**I. táblázat** A 19S regulátor komplex alegységeinek homológjai *Drosophila melanogaster*-ben, *Homo sapiens*-ben és *Saccharomyces cerevisiae*-ben

Az Rpn10 alegység génjét nem tartalmazó sarjadzó élesztőből nyert fehérjemintában a 19S regulátor komplex fiziológiásnál nagyobb sókoncentráció hatására két különálló komplexre esik szét, amelyet alapnak (base) és fedőnek (lid) neveztek el<sup>68</sup>. Az alap a 20S komplexszel szomszédos hat AAA ATPáz, valamint négy másik, nem ATPáz alegységet, az Rpn1 és 2-t, az Rpn10-et, valamint az Rpn13-at<sup>145,146</sup> foglalja magába (4. ábra). A fedő a maradék, összesen kilenc alegységet tömörít<sup>45</sup>, amelyek az alapra épülnek távolabb a 20S-től. Ezek a sztöchiometrikus (1:1) alkotóelemek, amely számos tisztítási lépésben együtt frakcionálódnak, képezik a szorosan vett proteaszómát. A proteaszóma magjához számos szubsztöchiometrikus elem kapcsolódik, amelyeket fontos szerepük miatt a proteaszómához sorolunk. Ezek száma rohamosan nő az utóbbi időben, köszönhetően az egyre enyhébb és gyorsabb tisztítási eljárásoknak és a tömegspektrometria fejlődésének<sup>69</sup>. A fedő alkomplex 8 szorosan vett tagjának mindegyike szekvenciahomológia szerint megfeleltethető két másik, hasonló felépítésű komplex egy-egy tagjának<sup>68</sup>. A két másik komplex a COP9 szignalszóma és az eukarióta iniciációs faktor 3. A COP9 szignalszóma szerepét a növényi fotomorfogenezisben írták le, de ma már számos szignalizációs folyamattal hozzák kapcsolatba az egész eukarióta élővilágban. Kimutatták, hogy képes interakcióba lépni a fedő alkomplexszel, és ez számos hipotézisnek adott alapot, többek között annak is, hogy a szignalszóma képes lehet a fedőt helyettesítve a regulátor komplexben alternatív fedőként a proteaszóma működését befolyásolni.



### A 19S regulátor alap alkomplexe

A 20S komplex  $\alpha$ -alegységei közvetlenül kapcsolatban vannak a regulátor komplex hat egyedi ATPáz alegységével<sup>45</sup>. Ezek az ATPázok az AAA/CAD szupercsaládba tartoznak és egy hattagú gyűrűt alkotnak a 20S felszínén és a regulátor alapján. Az AAA típusú ATPázok 230 aminosav hosszú AAA modult tartalmaznak. Ezen belül helyezkednek el a P-hurok ATPázokra jellemző Walker A és B ATPáz motívumok, és ezenkívül egy második homológ régió, amelynek funkciója nem ismert<sup>45</sup>. Ezek az ATPázok képezik általános vélekedés szerint a regulátor komplex motorját, mivel az ATP hidrolízis képessé teheti őket olyan energiát igénylő műveletek elvégzésére, mint a szubsztrát kitekerése, a 20S kapu felnyitása és a szubsztrát transzlokációja a katalitikus kamrába. Ezeket a funkciókat, különösen a kapuzást, már számos bizonyíték támasztja alá<sup>71</sup>. Az ATPáz funkció ezenkívül szükséges a 26S proteaszóma alkotórészeiből történő létrejöttéhez. Az ATPázok reverz chaperonként működhetnek a szubsztrát kitekerésében<sup>72,73</sup>. Más AAA típusú ATPázok (mint pl. a Cdc48/p97<sup>147</sup>) is hattagú gyűrűket alkothatnak. A proteaszómális ATPázok N-terminális régiójáról feltételezik, hogy mediálja az ATPáz alegységek közti interakciókat és a szubsztrátok felismerését, mivel coiled coil struktúrákat alkot, de más AAA ATPázok az ATPáz doménen keresztül oligomerizálódnak. Mindegyik ATPáz alegység esszenciális sarjadzó élesztőben<sup>45</sup>.

Finley és munkatársai 1998-ban egyenként mind a 6 sarjadzó élesztő ATPáz alegység esetében a Walker A motívumban fellelhető konzervált, az ATP foszfátját kötő lizint konzervatív vagy nem konzervatív módon helyettesítették más aminosavakkal<sup>70</sup>. Ezáltal ugyanolyan mutációt sikerült létrehozni az összes ATPázban, így a mutációk hatásai összehasonlíthatóvá váltak. Három csoportba sorolták súlyosság alapján a mutánsokat: az Rpt2 mutációja okozta a legsúlyosabb fenotípust, mivel még egy konzervatív helyettesítés is letális volt. Az Rpt3,4 és 6 konzervatív helyettesítését hordozó élesztő túlélte, míg a nem konzervatív helyettesítés letális volt. A harmadik csoportba tartozott az Rpt1 és 5, melyek a konzervatív és nem konzervatív helyettesítést is jól tolerálták, noha az *rpt5* mutáns lassabban nőtt, mint az *rpt1*. Kanavanin stresszre az *rpt1* és 5, nem konzervatív helyettesítést hordozó mutánsok súlyos növekedési defektust mutattak. A kanavanin egy arginin analóg, amely ha beépül a fehérjébe, annak szerkezete megváltozik és a proteaszóma



szubsztrátjává válik. A kanavanilált fehérjék tömege telítheti az ubiquitin-proteaszóma utat és ez sejthalálhoz vezet. Ezek az eredmények jelzik, hogy az ATPáz alegységek funkcionálisan nem redundánsak.

Modellszubsztrátok lebontását vizsgálva megállapítható volt, hogy az *rpt1*-et kivéve, amely jól bontott még kanavanint tartalmazó szubsztrátokat is, minden mutánsban stabilizálódnak a szubsztrátok. Általában a mutánsok G2/M késést mutattak a sejtciklusban, míg az *rpt1* mutáns a G1-ben rekedt meg. Az *rpt1,3* és 6 mutánsok nem befolyásolták a 26S proteaszóma összeszerelődését, noha ez egy ATP kötéstől függő folyamat. Létrehoztak egy részben menekített *rpt2* mutánst, amelyben egy olyan szupresszor változatát expresszálták a génnek, ahol a Ser241-et helyettesítették fenilalaninnal. Ebben a mutánsban nem történt meg a proteaszóma összeszerelődése. Minden pontmutáns ATPáz képes volt beépülni a 26S komplexbe. A részben menekített *rpt2* mutánsban a proteaszóma peptidáz aktivitása egy nagyságrenddel lecsökkent és a tisztított proteaszóma nem bontotta az ubiquitinált fehérjéket. Szintén Finley és csoportja 2001-ben bizonyította, hogy az Rpt2 alegység az, amely felnyitja a 20S komplex axiális csatornáját, az  $\alpha$ -alegységek N-terminálisait eltávolítva a szubsztrát elől<sup>71</sup>. Kísérleteikben a részben menekített *rpt2* mutációt kombinálták N-terminálison csonkolt  $\alpha$ -alegység mutánsokkal, amelyeknek központi csatornája folyamatosan nyitott. Kiderült, hogy az  $\alpha$ -alegység mutációk szupresszálják az *rpt2* mutáció peptidáz aktivitás csökkentő hatását a 26S forma esetén.

Az ATPáz alapú regulátor komplexek nem csak az eukarióták között fordulnak elő. A PAN (proteasome-activating nukleotidase) a *Methanococcus jannaschii* Archaea AAA típusú (ATPases associated with various activities) ATPáza. Ez a 19S ATPázaihoz szekvenciaszinten hasonlóságot mutat. A rekombináns PAN nagy molekulatömegű komplexet képez és aktiválja NTP (nukleotid-trifoszfát) függő módon a *Thermoplasma* 20S proteaszóma fehérjebontását. *Escherichia coli*-ban és más, nem *Aktinomycaeta* eubaktériumokban a HslV 20S jellegű proteolitikus komplex kapcsolódik a HslU (ClpY)-hoz, amely az ATPázok Hsp100/Clp családjába tartozik. A prokarióta ATPázok, mivel más szubsztrátfelismerő komponens nincs jelen, valószínűleg nem csak kitekerik és közvetítik a proteolitikus helyre a szubsztrátot, hanem fel is ismerik azt<sup>45</sup>.

Az első proteasómális ATPáz géneket még úgy azonosították élesztőben és emberben, hogy nem tudták róluk, hogy a proteasóma komponensei. Ennek ellenére funkciójuk nem volt kétséges: az eukarióta transzkripcióban játszottak szerepet ezek a fehérjék. 1992-ben Johnston és munkatársai egy *Gal4* mutáció szupresszoraként azonosítottak két mutánst, a *sug1* és 2-t, amelyek később az Rpt6 és 4 ATPázok mutánsainak bizonyultak<sup>74,75</sup>. De eredetileg transzkripciós aktivátorokként ismerték fel szerepüket, ugyanúgy, mint az Mss1-ét, amelyet a HIV Tat fehérje pozitív modulátoraként közöltek le<sup>76</sup>. Mára kiderült, hogy az Mss1 valójában S7-ként (Rpt1) az egyik proteasómális ATPáz. Minthogy felderítették, hogy ezek a fehérjék a proteasóma részei, kézenfekvő volt a magyarázat, hogy a fehérjelebontásban segédkezve vesznek részt a transzkripció iniciációjában. Ezt a koncepciót alátámasztani látszik, hogy számos transzkripciós faktor és maga az RNS polimeráz II legnagyobb alegysége is degradálódik a proteasómában<sup>77</sup>. Ilyen transzkripciós faktorok például a Gcn4, a MAT $\alpha$ 2, a p53, a c-Jun, a c-Fos és a MyoD.

Mégis számos genetikai és biokémiai adat sugallja, hogy a 20S komplex nélkül (azt deletálva vagy gátolva) a 19S önmagában képes a transzkripció aktivációjára, különösen bizonyos élesztő promotereken, mint pl. a *Gal1-10* promoter és a *Gal4*, hő-, valamint oxidatív stressz indukálta promoterek. Kimutatták továbbá a 19S komplex szerepét a DNS javításban<sup>78</sup> és a transzkripció elongációjában<sup>79</sup> is. A Rad23 funkciója sejtetni engedi a regulátor komplex szerepét a DNS javításban. A 26S vagy 20S komplex transzkripciót szabályozó működésére bizonyíték az, hogy a transzkripció terminációjához szükséges a 20S komplex, mivel ez feldúsul a terminációs helyeken és gátlása csökkenti a sikeres termináció valószínűségét<sup>77</sup>. A LIM transzkripciós faktorok esetén a koaktivátor komplexek csak a korepresszor komplexek proteasómális lebontása esetén tudnak hozzáférni a kötőhelyükhöz. A nem proteolitikus funkcióknál az ATPáz alegységek chaperon-reverz chaperon aktivitása kerül előtérbe<sup>72,73</sup>. Feltételezhetően a kitekerő funkciók azok, amelyek például az elongációt segítik a FACT komplexszel kölcsönhatva. A H3-as hiszton metilációja függ az Rpt4 és 6-tól és a H2B ubiquitinációjától<sup>77</sup>.

A legerősebb mai bizonyíték a 19S önálló működésére az, hogy 20S partikulum nélkül komplexet formál a SAGA koaktivátorral, amelynek transzkripciós faktorokkal, pl. a *Gal4*-gyel való interakcióját fokozza<sup>80</sup>. Kromatin immunprecipitációs kísérletekből kiderült, hogy élesztő genomon a 19S és 20S

komplexek kötőhelyei átfedőek, de nem azonosak<sup>81</sup>. Szintén érdekes eredmény, hogy a Cdc20 (APC/C aktivátor) gén promoterére élesztőben a Cks1 (a ciklin-CDK komplex 3. alegysége) kiköti a proteaszómát, hogy a transzkripció aktivációjában részt vegyen<sup>82</sup>.

Számos ATPáz alegység, köztük az Rpt1 és ortológjai képesek alap transzkripció faktorokkal kölcsönhatni, komplexet képezni, amelyben nem figyelhető meg a 20S partikulum<sup>83,84</sup>.

Az Rpt1 ATPáz különlegesnek bizonyult a Finley csoport munkája alapján<sup>70</sup> abból a szempontból, hogy az ATPáz domén aktív helyének elrontása nem okozott súlyos fenotípust és minden modellszubsztrátot jól bontott a mutáns proteaszóma. Azonban a gén olyan mutációja, amely egy léziót okoz a kódoló régióban<sup>86</sup>, G2/M fázisban való megállást és nagyon lassú növekedést<sup>85</sup> váltott ki sarjadzó élesztőben. Az *rpt1* null mutáns az élesztő esetében letális<sup>87</sup>. Más élőlényekben kevés genetikai adat áll rendelkezésre erről az alegységről. Egyedül *Drosophila* S2 sejtenyészetben végzett RNS interferencia mutatta ki, hogy a lecsökkent *Rpt1* RNS szint gátolta a sejtproliferációt, megnövelte az apoptózis valószínűségét, csökkentette bizonyos peptidek proteolízisét, a kezelt sejtekben szétesett a 26S proteaszóma, nagyobb mennyiségű 20S komplexet eredményezve és ez megnövelte a poliubiquitinált fehérjék mennyiségét<sup>88</sup>. Az emberi S7/Rpt1-ről kimutatták, hogy foszforiláltan fordul elő sejten belül<sup>89</sup>. Az élesztő *rpt1-2* az *rpn12*-vel genetikai kölcsönhatást mutat, mutációik szintetikusan letálisak<sup>90</sup>. A rekombináns Rpt1Rpt2 heterooligomer *in vitro* képes egyes szubsztrátok proteaszómális degradációját fokozni<sup>91</sup>. Az Ubr2 ubiquitin ligáz deléciója az *rpt1* mutációval kombinálva szintetikus növekedési defektust eredményez RPN4 túltermelés esetén<sup>92</sup>. Az eukarióta transzláció elongáció faktor 1A képes kotranszlációsán sérült, emiatt multiubiquitinált fehérjéket a proteaszómához szállítani, ahol az Rpt1-en kötődik<sup>93</sup>. Az Rpt1 alegység mutációja gátolta ezt a lebontási utat. Az Ubc4 enzim, amely ebben az útban ubiquitinál, szintén az Rpt1-en keresztül kötődik a proteaszómához<sup>94</sup>.

Az alaphoz tartozik még az Rpn1 és Rpn2, valamint az Rpn10/S5a/p54. Az előbbi kettő 20% szekvenciahasonlóságot mutat egymással. Az Rpn1 és 2 C-terminális 400 aminosavában leucingazdag 35-40 aminosavas ismétlődések találhatók. Hasonló ismétlődések jelennek meg az APC/C legnagyobb alegységében, az Apc1-ben is. Az Rpn1 és 2 ubiquitin interakciós motívum-szerű szekvenciákat is tartalmaz. Mindkettő kapcsolatot létesít ATPáz és fedő alegységekkel is, így alakult ki

az a nézet, hogy ezek az alegységek képezik a regulátor gerincét, egyfajta vázat alkotnak, amelyen a többi alegység működik. Ezt erősíti, hogy az ubiquitin ligázok és UBL-UBA domén fehérjék, valamint az Rpn10/S5a/p54 is az Rpn1-hez horgonyozódnak<sup>45,33,34</sup>.

Az Rpn10/S5a/p54 alegység volt az első proteaszómális fehérje, amelyről bebizonyosodott, hogy *in vitro* 48-as lizinen keresztkötött multiubiquitin láncokat képes kötni<sup>29</sup>. Azóta az egyik ATPázról, az S6'/Rpt5-ről is ismert, hogy fotoaktivált keresztkötő szerrel multiubiquitin láncokhoz köthető<sup>44</sup>. Az S5a-ról kiderült, hogy ez az egyetlen alegység, amely több fajban jelentős mennyiségben előfordul monomer, proteaszóma által nem kötött formában<sup>95,45</sup>. Ez vezetett a hipotézishez, hogy egyfajta ingázó faktorként szubsztrátokat szállít a citoszolból a proteaszómához<sup>96,97</sup>. Az S5a fehérje C-terminális felében két, ubiquitin interakciós motívumnak (UIM) nevezett szekvencia is található, amely a négynél nagyobb tagszámú ubiquitin láncok hidrofób felszínével lép kölcsönhatásba<sup>45</sup>. A C-terminálisabb UIM a sarjadzó élesztőből hiányzik, minthogy ennek Rpn10-e rövidebb emlős és *Drosophila* ortológjainál. A sarjadzó élesztő *Rpn10/S5a/p54* deléciója nem okozott detektálható fenotípust, csupán a modellszubsztrátok némelyike stabilizálódott benne és érzékenyebb volt aminosavanalógokra, például kanavaninra<sup>95</sup>. Ezenkívül megemelkedett az ubiquitin-fehérje konjugátumok egyensúlyi szintje. Ez a megfigyelés vezetett végül más ubiquitin receptorok, pl. a Rad23 és a Dsk2 szerepének felderítéséhez. Az új ubiquitin receptorok felfedezése azt sugallta, hogy az Rpn10 jelentősége elhanyagolható a szubsztrátfelismerés szempontjából. Az Rpn10 magasabbrendű ortológjainak genetikai vizsgálata viszont egészen más eredményt adott. A *Physcomitrella patens* alga fejlődése megáll az Mcb1/Rpn10 hiányában<sup>98</sup>, Arabidopsisban az *rpn10* mutáns pleiotróp fenotípust mutat. Többek között jellemző rá a csökkent csírázási képesség, gyengébb növekedés, kisebb porzós szám és csökkent hormon indukált sejtosztódás<sup>99</sup>. *Drosophilá*-ban bábletális a Rpn10/S5a/p54 deléciója<sup>100</sup>. A *Drosophila* p54 mutáns lárvák agya mitotikus defektusokat mutatott, a bábokban felszaporodtak a multiubiquitinált fehérjék és megnövekedett a 26S proteaszóma mennyisége is. Az ubiquitin receptoroknál leírtak szerint ma már többet tudunk a proteaszómális és extraproteaszómális ubiquitin lánc felismerő faktorok szerepéről.

Az RPN4 csak sarjadzó élesztőben található meg, ahol nagyon fontos szerepet tölt be: negatív visszacsatolással serkenti az összes proteaszómális gén transzkripcióját, majd az összeszerelt proteaszómában ubiquitin függő és független

módon egyaránt bomlik<sup>101,102,103,92</sup>. Kapcsolódik az Rpn2-höz, így akár alegységnek is tekinthetjük. Az RPN4-et az Ubr2 ubiquitin ligáz jelöli ki a lebontásra<sup>92</sup>. Vannak arra utaló adatok, hogy magasabbrendűekben esetleg a Rpn10/S5a/p54-nek lehet hasonló transzkripció aktivátor szerepe<sup>100,104</sup>.

### A 19S regulátor fedő alkompexe

A fedő alkompex alegységeinek szerepe ma még viszonylag kevésbé ismert. A legtöbb alegység esszenciális élesztőben, kivéve az Rpn9-et<sup>45</sup>. A hipomorf mutációk csupán multiubiquitinált fehérjék felszaporodását és sejtciklusblokkot okoznak, de segítségükkel nem sikerült még az alegységek egyedi sajátosságait megismerni. Ez alól kivétel az Rpn11 és az Rpn12. Az Rpn12 *nin1-1* mutációja a G1/S és a G2/M átmenetben egyaránt blokkot okoz és befolyásolja a sejtmag integritását<sup>45</sup>. Az Rpn11 egyedi funkciójára élesztőben és emlősökben 2002-ben bukkantak rá<sup>107,108</sup>. Az alegységben és COP9 szignálszóma párjában, a Jab1/Csn5-ben is jelen van egy Jab1/MPN domén-asszociált metalloizopeptidáz (JAMM) motívum, amely egy  $Zn^{2+}$ -et képes koordinálni<sup>105</sup>. A JAMM motívum aktív hisztidinjeit alaninra helyettesítve a proteaszóma képtelen volt deubiquitinálni a multiubiquitinált Sic1-et<sup>108</sup> és a mutáció letálisnak bizonyult. Kiderült, hogy a proteaszómában az Rpn11 alegység az, amely biztosítja az ubiquitin lehasadását a szubsztrátról, mielőtt az a katalitikus komplexbe táplálódna. A lehasadás nélkül a szubsztrát nem halad tovább a központi csatornában. A deubiquitinációs reakció  $Zn^{2+}$ -függő volt. Hasonlóképpen a Jab1/Csn5 is egy ubiquitinszerű fehérjét, a Nedd8-at távolít el az SCF ubiquitin ligáz komplex Cul1 alegységéről  $Zn^{2+}$ -függő módon<sup>109</sup>. A fent említett jelenségeket *Drosophila* és emberi sejtenyészetekben is megfigyelték<sup>110</sup>. Ma már ismert, hogy más proteaszóma asszociált deubiquitináló enzimek, mint pl. az Ubp6 is részt vesznek a szubsztrátok deubiquitinálásában, együttműködve az Rpn11-gyel<sup>106</sup>. *Drosophilában* és emberben a p37A/Uch37 ubiquitin C-terminális hidroláz alegység is képes deubiquitinációra<sup>111</sup>. Sarjadzó élesztőben az Ubp6 előbb működik a degradációs folyamatban, mint az Rpn11: míg az Rpn11 egészen távolítja el az ubiquitin láncot, addig az Ubp6 a lánc végéről távolít el szukcesszív módon egy-egy ubiquitint, ezzel csökkentve a proteaszómális degradáció valószínűségét. Az Ubp6-nak van egy másik, proteaszóma gátló aktivitása is, amely úgymond időablakot teremt

a deubiquitináló aktivitásnak, hogy a szubsztrátot részben deubiquitinálja. Tehát az Ubp6 ellene hat a célfehérje degradációjának, míg az Rpn11 elősegíti azt<sup>148</sup>.

A Hul5 ubiquitin ligáz az élesztő proteaszómához szorosan asszociált fehérje, amelynek aktivitása proteaszóma függő. Mint felfedezték, a Hul5 képes meghosszabbítani azokat a multiubiquitin láncokat, amelyek a proteaszómához érkeznek. A Hul5 aktivitást ellenpontoszza az Ubp6 működése, amely elhidrolizálja a Hul5 által meghosszabított láncot. A *hul5* nullmutánsban számos szubsztrát degradációja csökken. A *hul5* nullmutáns szupresszálja az *ubp6* nullmutánst, vagyis a Hul5 és Ubp6 fehérjék egymással ellentétes aktivitást fejtenek ki<sup>149</sup>. Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy az ubiquitin láncok keletkezésének és hidrolízisének folyamatos egyensúlya biztosítja az optimális proteaszómális lebontást.

## Célkitűzések

A proteasómális ATPázok egyedi tulajdonságai, különösen magasabbrendű eukariótákban, ma még kevésbé ismertek. Ma már a *Drosophila melanogaster*-ben P-elemek által okozott mutációk gyűjteménye széles körben hozzáférhető. Kutatásaink során célul tűztük ki, hogy *Drosophila* mutánsok vizsgálatával a regulátor komplex ATPáz tagjainak, köztük az Rpt1-nek a funkcióját mélyebben megértsük. Terveztük vizsgálni egy hipomorf *Rpt1* mutáns törzsben:

- a mutáció hatásmechanizmusát
- a proteasóma szerkezeti összetettségét
- a multiubiquitinált fehérjék és szubsztrátfehérjék felszaporodását
- az Rpt1 foszforiláltságát és kromatinhoz való kapcsolódását
- Rad23B fehérje előfordulását
- a mutáció genetikai interakcióit és mitotikus fenotípusát.

Feltételezésünk szerint az *Rpt1* mutánsok fényt derítenek ennek az alegységnek a proteasóma szerveződésében, szabályozásában, szubsztrátfelismerésében és a transzkripcióban betöltött szerepére.

## Anyagok és módszerek

Az összes keresztezést és az ecetmuslinca törzsek fenntartását 25 °C-on, standard (élesztő, kukoricaliszt, szacharóz és agar) *Drosophila* táptalajon végeztük.

### Új allélok létrehozása P-elem remobilizációval

Ahhoz, hogy mobilizáljuk a  $P\{\text{lacW}\}RptI^{k11110}$  elemet,  $w$ ;  $P\{\text{lacW}\}RptI^{k11110}/CyO$  szűz legyeket kereszteztünk  $w$ ;  $CyO$ ,  $P\{\Delta 2-3\}/Bc\ Gla\ Fr$  hímekhez. A következő generációból a  $w$ ;  $P\{\text{lacW}\}RptI^{k11110}/CyO$ ,  $P\{\Delta 2-3\}$  „jumpstarter“ hímeket  $yw$ ;  $CyO/Sco$  szüzekhez kereszteztük. Az ebből kikelő fehér szemű legyeket ( $\Delta P\{\text{lacW}\}RptI^{k11110}/CyO$ ), amelyekből feltehetőleg hiányzott a P-elem, kereszteztük  $yw$ ;  $CyO/Sco$  legyekhez, hogy törzset alapítsunk az utódokból. Ezeket a törzseket teszteltük komplementációra az eredeti P-elem mutáns törzzsel és a nem komplementálókat vizsgáltuk tovább. Ezek letálfázisának meghatározásához a  $CyO$ ,  $P\{ActGFP\}JMRI$  balanszer kromoszóma felett fenntartott allélokra homozigóta L1 lárvákat gyűjtöttünk Leica MZFLIII fluoreszcens mikroszkóp alatt és vizsgáltuk letálfázisukat. A letálfázis meghatározása a komplementációs tesztnél olvasható. A  $RptI^{P1}$  mutánst  $T(2;3)TSTL, CyO:TM6B$  balanszer felett tartottuk fenn és ezt a törzset használtuk az összes biokémiai kísérletben.

### Az *RptI/p48B* mutáció fenotípusának menekítése az *RptI* ektopikus expressziójával

Azért, hogy a pCaSpeR4-Ubi-p63E promoter-*RptI* menekítő DNS konstrukciót létrehozzuk, a RHXpHSS7-Up2 plazmid<sup>114</sup> NotI-BamHI fragmentjét, amely az Ubi-p63E promotert tartalmazta, ligáltuk a pBluescript II KS vektor NotI-BamHI helyeire. Ebben az elkészült konstrukcióban elrontottuk az NcoI helyet azáltal, hogy ezzel az enzimmal vágtuk, Klenow polimerázzal feltöltöttük és ligálással recirkularizáltuk a plazmidot. Ezt a konstrukciót emésztettük BamHI és NotI-gyel, az ebből az emésztésből származó 2,2 kilobázispárnyi (kb) fragmentet izoláltuk agaróz



gélből a QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével és a hasított pCaSpeR4 vektor<sup>115</sup> BamHI és NotI helyeire ligáltuk. Az *Rpt1/p48B* gént és a környező genomi régiót PCR-rel amplifikáltuk *w*<sup>1118</sup> adult genomiális DNS-t használva templátként az *Rpt1* promoter fwd (5' TAGAAGTTAAAAGTGGCTACACATC 3') és far *Rpt1* rev (5' TACGATCGCCTCGGACTTATCATCACTC 3') primerek segítségével (30x [95°C 30 sec, 52°C 1 min, 68°C 3 min]). A PCR terméket a PCR Clean-up Kit-tel (V-Gene) tisztítottuk, Mph1103I és NheI enzimekkel vágtuk és ligáltuk a hasított pCaSpeR4-Ubi-p63E promoter vektor PstI és XbaI helyeire. A kész plazmidot szekvenáltattuk és a szekvencia hibáit, amelyeket a PCR reakció okozott, kijavítottuk olyan módon, hogy restrikciós endonukleázokkal kivágva a hiba körüli régiót, ezt a részt hibátlan szekvenciájú *Rpt1* klónból származó azonos fragmentekkel pótoltuk. A pCaSpeR4-Ubi-p63E promoter-*Rpt1* konstrukciót és a p $\pi$  25.7 WC segédplazmidot, amely a  $\Delta$ 2-3 P-elem transzpozázt tartalmazta, *w*<sup>1118</sup> embriókba injektáltuk. A transzformált legyeket a *w*<sup>+mC</sup> marker jelenlétére szelektáltuk<sup>116</sup>. A P-elem kromoszómális lokalizációját megállapítottuk és a homozigóta életképes vonalakat használtuk fel a menekítésre.

## Polimeráz láncreakció

Az inverz PCR-t a Berkeley *Drosophila* Genome Project Resources weblapon (<http://www.bdgp.org/about/methods/inverse.pcr>) leírt módszer szerint végeztük a Plac1 és Plac4 primerekkel. A P-elem remobilizáció által okozott mutációk kimutatására használt primerek a következők voltak: *Rpt1* rev (5' GATAAGCTTGTGTAGGTCATGTAGCGTGGAGTGG 3') és *Rpt1* promoter fwd (5' TAGAAGTTAAAAGTGGCTACACATC 3') pár (35x[95°C 30 sec, 51°C 1 min, 68°C 2.5 min]), valamint a far*Rpt1*fwd (5' TCGTGGGCTGCTGCTTAGAACAAAC 3') és far*Rpt1*rev (5' TACGATCGCCTCGGACTTATCATCACTC 3') pár (35x[95°C 30 sec, 60°C 1 min, 68°C 4.5 min]). A genomiális DNS-t a BDGP módszere (lásd fentebb) szerint preparáltuk. A PCR-re a GoTaq™ DNS polimerázt (Promega) használtuk.

### Szemikvantitatív reverz transzkripció kapcsolt PCR

A totál RNS-t Trizol™ reagenssel (Invitrogen) izoláltuk 5-10 darab lárvából és bábból. Miután RQ1 RNáz mentes DNázzal (Promega) kezeltük az RNS-t, a mintákat reverz transzkripciónak vetettük alá a RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) és random hexamer primerek felhasználásával. Azért, hogy összehasonlítsuk a relatív *RpL23* cDNS koncentrációt a mintákban, különböző mennyiségű vad (*w*<sup>1118</sup>) és mutáns (*Rpt1*<sup>PI</sup>) cDNS-t PCR-eztünk *RpL23* riboszóma alegység specifikus primerek segítségével (*RpL23* upper: 5' GTGATGAACTGTGCCGACAA 3' és *RpL23* lower: 5' CCTTCATTTGCGCCCTTGTTG 3'), GoTaq™ DNS polimerázt és 20 amplifikációs ciklust használva (20x[95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 68°C 30 sec]). A PCR termékeket agaróz gélen detektáltuk és azokat a cDNS mennyiségeket, amelyek azonos sávdenzitást mutattak a vad és mutáns mintákat összehasonlítva, használtuk az *Rpt1* és *Rad23B* cDNS-ek amplifikációjára a real-time PCR-nél felsorolt primerekkel (35x[95°C 30 sec, 60°C 20 sec, 68°C 20 sec]), illetve az *Rpt1* ORF fwd (5'-ACTACCTGGGCGACGACCA-3') és *Rpt1* 1/3 rev (5'-TCTTGGGAGGCAGCGGAATG-3') primerpárral (35x[95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 68°C 30 sec]). 35 amplifikációs ciklus után a termékeket agaróz gélen futtattuk és fotóztuk. A *CG17985* cDNS amplifikációjára használt primerek a következők voltak: *CG17985* új fwd: 5'GCAATGCGCGCCAACAACAA 3' és *CG17985* új rev: 5'CGTAGGGTTGCTCCATATTGGCTTC 3'. A hozzájuk tartozó program 35x[95°C 30 sec, 58°C 30 sec, 68°C 40 sec] volt.

### Real-time PCR

A felhasznált primerek a következők voltak:

*Rad23*realtfwd (5' ACGGGATTCTGATTACAAAAGGT 3'),

*Rad23*realtrev (5' CTAGACGAATCGCGTGTC AA 3'),

*Rpt1* realt rev (5' CTTGTCCTCCTTCTCATCGTGCTTCA 3')

és *Rpt1* cDNS fwd (5' TTCTCCCATCTCTATGCCAAATTGTTTCAGTC 3').

Ahhoz, hogy kvantitatív módon összehasonlítsuk az *Rpt1*, *Rad23B* és *rosy* mRNS-ek mennyiségeit, totál RNS-t izoláltunk az RNeasy Kit-tel (Qiagen) *w*<sup>1118</sup> és *Rpt1*<sup>PI</sup>

mutáns bábokból a gyártó cég utasításait követve. Az egyszálú cDNS-t 1 µg RNS-ből szintetizáltuk a TaqMan Reverse Transcription Reagent (ABI) felhasználásával. A *Rad23B*, *Rpt1* és *rosy* mRNS-ek relatív koncentrációját kvantitatív RT-PCR-rel (ABI Prism 7300) határoztuk meg a megfelelő cDNS-ekre, valamint a *18S rRNS*-re, mint kontrollra specifikus primerek felhasználásával a SYBRGreen festék inkorporációját követve. A 18Fw, 18Rev, ry F és ry R *18S rRNS* és *rosy* specifikus primereket már máshol leírták<sup>112</sup>. A  $C_T$  értékeket két nagyságrenden átívelő kalibrációs görbéhez mértük. A  $\Delta\Delta C_T$  módszert<sup>113</sup> használtuk a relatív gyakoriságok számolására. Minthogy az *Rpt1* intron nélküli gén, a *rosy* PCR termékek olvadási görbéjének analiziséből következtettünk a genomi DNS szennyeződés esetleges jelenlétére a preparátumokban.

### Komplementációs teszt

A *Df(2R)ED1715* és *Df(2R)ED1725* deficienciákat a szegedi *Drosophila* törzsközpontból szereztük be és a komplementációs tesztekben *Df(2R)ED1715/CyO,GFP*-ként és *Df(2R)ED1725 /CyO,GFP*-ként használtuk őket. A *CyO,GFP* felett fenntartott *Rpt1* allélokat kereszteztük ezekhez a deléciókhöz és a keletkező hemizigótákból 100 darabot Leica MZFLIII fluoreszcens mikroszkóp alatt kiválogattunk L1 stádiumos korukban. Ezeket az állatokat málnaszörppel és D-glükózzal dúsított agaron tartottuk 25°C-on. A hemizigóták letálfázisát aszerint határoztuk meg, hogy melyik stádiumban pusztult el a 100 darab állat több, mint 50%-a. A négy eredeti P-elem inszerciót, valamint a *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> allélt is balanszíroztuk *CyO,GFP*-vel és a többi *Rpt1* alléllal együtt használtuk a tesztben.

### Fehérjeminták preparálása

A bábokat és lárvákat proteaszóma pufferben (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT and 5% glicerín) vagy Laemmli SDS mintapufferben tártuk fel mikroPotter homogenizátorral. A proteaszóma pufferben feltárt mintákat 4 °C-on, 12 500 g-n 15 percig centrifugáltuk. A lebegő lipoprotein szennyezés eltávolítása végett a felülúszókat enyhe centrifugálás mellett steril

üveggyapoton 4 °C-on megszűrtük. A natív gélelektroforézis, az immunoblot analízis és a poliklonális és monoklonális ellenanyagok leírása korábban részletesen megtörtént<sup>97,120</sup>. A poliklonális anti-ubiquitin ellenanyagot a DAKO cégtől szereztük be, az anti-Rad23A ellenanyagot nyúlban termeltettük bakteriálisan expresszált, majd tisztított Rad23A fehérje ellen. Az anti-Cim5 ellenanyagot a 85. hivatkozás ismerteti. A poliklonális anti-ciklinA és anti-ciklinB ellenanyagokat nyúlban termeltettük bakteriálisan expresszált fehérjék ellen. Ezek az ellenanyagok egy sávot ismertek fel bábextraktal végzett immunoblotokon, és immunfluoreszcens festéssel jellegzetes mintázatot adtak vándorló L3 lárvák agyán: a mitotikus húzófonalak környékén dúsultak fel az osztódó sejtekben (Deák Péter és Deákné Pál Margit, készülő kézirat). A burgonya savas foszfátázzal (Calbiochem) végzett defoszforilációs kísérletben a foszfátáz reakciópuffere 50 mM PIPES pH 5.8 és 1 mM DTT volt. A mintákat 1 unit/ml foszfátázzal inkubáltuk 30 °C-on 1 órán át.

### Kétdimenziós gélelektroforézis

*w<sup>1118</sup>* embriókból, bábokból és adult állatokból, valamint *RptI<sup>PI</sup>* mutáns bábokból citoplazmatikus és magi extraktumot készítettünk a Bio-Rad ReadyPrep<sup>TM</sup> Protein Extraction Kit (Cytoplasmic/Nuclear) felhasználásával. A citoplazmatikus extraktumokat tovább tisztítottuk a ReadyPrep<sup>TM</sup> 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) segítségével. A kicsapott fehérjéket feloldottuk az erősen kaotropikus 2-D rehidrációs pufferben (7M urea, 2M thiourea, 4%(w/v) CHAPS, 50mM DTT, 2%(w/v) IPG puffer pH 4-7, 0,002%(w/v) brómfenolkék) (Bio-Rad). A mintákat Immobiline<sup>TM</sup> DryStrip gélekre (pH 4-7, 18 cm) (Amersham Biosciences) vittük rehidrációs módszerrel. A Multiphor<sup>TM</sup> II laposágyú elektroforetikus egységet (Pharmacia Biotech) használtuk az első dimenziós izoelektromos fókuszáláshoz (teljes időt tekintve 21 kVh futás) és egy 7%-os vertikális SDS poliakrilamid gélt a második dimenzióhoz.

### Nyálmirigy óriáskromoszóma preparálás és immunfestés

Vándorló L3-as állapotú lárvák nyálmirigyéből készítettük az immunfestésre szánt kromoszómapreparátumot. A kiboncolt nyálmirigyet 3.7% formaldehidben (Sigma) és PBST-ben fixáltuk, majd 45% ecetsavval (Merck) kezeltük PBS-ben.

Tárgylemezen erős nyomással szétnyomtuk a nyálmirigyet és a fedőlemezt folyékony levegős fagyasztás után lepattintottuk. A lemezeket PBST+5% borjúsérumban blokkoltuk 1 órán át 25 °C-on. Az elsődleges ellenanyagot (anti-Cim5) 1:50-hez hígítottuk a blokkoló oldatban és a lemezeket éjszakán át inkubáltuk vele. Ezután háromszor öt percre mostuk őket PBST-ben és az 1:500-hoz hígított másodlagos ellenanyaggal (kecske anti-nyúl IgG Alexa Fluor 555-höz konjugálva (Invitrogen)) inkubáltuk a mintákat 1 órán át 25 °C-on. Újabb háromszor öt perces PBST-vel történt mosás után a lemezeket lefedtük VectaShield beágyazó médiummal, amely DAPI-t tartalmazott és a mintákat OLYMPUS BX51 mikroszkóppal vizsgáltuk. A fotókat az OLYMPUS DP70 kamerával készítettük. A módszer részletesebb leírását a 117. hivatkozás ismerteti.

## Genetikai interakció

A genetikai interakció meglétét a második kromoszómás *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns és a harmadik kromoszómás *mks<sup>1</sup>*<sup>118</sup>, illetve a szintén harmadik kromoszómás, módosított *ΔRpn10/S5a/p54<sup>100</sup>* mutáns között teszteltük. Ez a *ΔRpn10/S5a/p54* törzs a két, nem *Rpn10/S5a/p54* gént menekítő transzgént és a három gént érintő deléciót egy kromoszómára rekombinálva tartalmazza. A tesztelő törzsek genotípusai *Rpt1<sup>P1</sup>/CyO,GFP*; *mks<sup>1</sup>/TM6* és *Rpt1<sup>P1</sup>/ CyO,GFP*; *ΔRpn10/S5a/p54/TM6* voltak.

## Neuroblaszt preparálás és citológiai jellemzés

Vándorló harmadik stádiumos lárvák agyát PBS-ben kiboncoltuk és egy csepp 45%-os ecetsavba helyeztük 30 másodpercre. Az agyakat ezután 45%-os ecetsavban oldott 3% aceto-orceinnel festettük 3-5 percre, majd a felesleges festéket néhány másodpercig 60%-os ecetsavban mostuk le. Ezután egy kis csepp 60%-os ecetsavban oldott 3%-os aceto-orceinbe helyeztük az agyakat, lefedtük fedőlemezzel, és szűrőpapírba csomagolva nagyon erősen nyomtuk 10-15 másodpercig. A fedőlemez széléit körömlakkal fedtük be és a preparátumokat fáziskontraszt mikroszkópban (OLYMPUS BX51) vizsgáltuk 40x és 100x objektívekkel.

# Eredmények

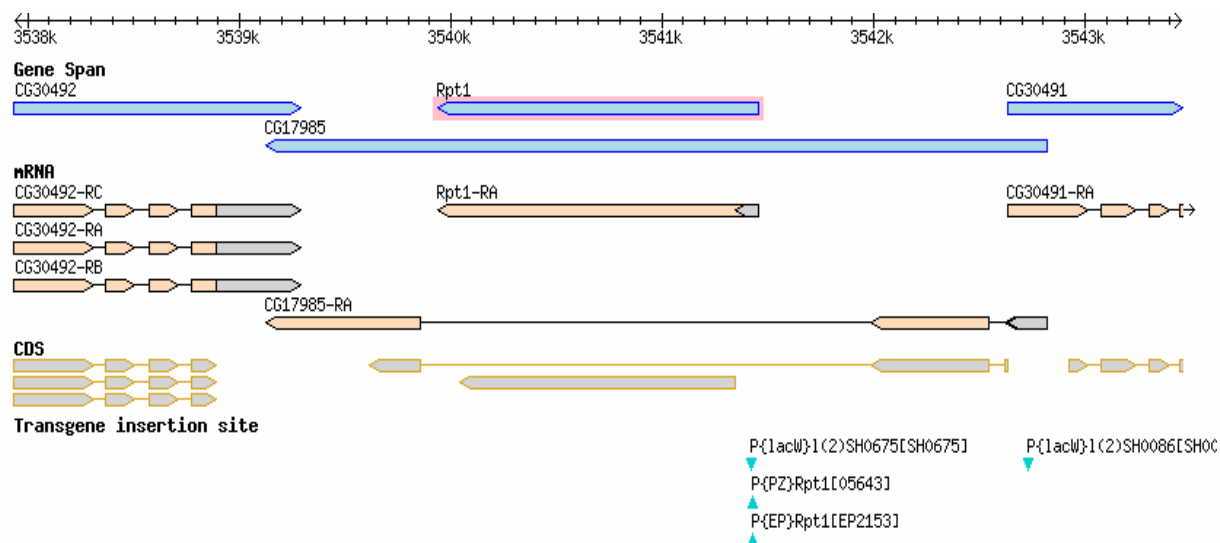
## I. Az *Rpt1* gén genetikai jellemzése

A bloomingtoni és szegedi *Drosophila* törzsközpontokban négy olyan letális P-elem mutáns található meg, amelyben a P-elem beépülése feltehetően az *Rpt1* gént érinti. Az adatbázisokban megtalálható egy ötödik inszerció is, a  $P\{\text{lacW}\}Rpt1^{k07513}$ , amely ma már nincs meg egyik törzsközpontban sem. Az *Rpt1* gén terméke a p48B fehérje, amely a *Drosophila* 26S proteaszóma regulátor komplexének integráns alkotórésze. Kísérleteink elvégzéséhez mind a négy fellelhető mutánst beszereztük, az  $Rpt1^{05643}$  és  $Rpt1^{k11110}$  allélokat Bloomingtonból, az  $Rpt1^{l(2)SH0675}$  és  $Rpt1^{EP(2)2153}$  allélokat Szegedről (5./A. ábra). A mutációért felelős transzpozon az  $Rpt1^{05643}$  esetén a  $P\{PZ\}$ , míg a  $Rpt1^{k11110}$  és  $Rpt1^{l(2)SH0675}$  esetén a  $P\{\text{lacW}\}$  volt. A  $Rpt1^{EP(2)2153}$  inszerció a  $P\{EP\}$  elem által okozott mutáció. A négy független vonalból egyenként genomiális DNS-t preparáltunk, azt Hin6I restrikciós endonukleázzal emésztettük, kis DNS koncentráció mellett az emésztményt ligáltuk és ezen a  $Plac1$  és  $Plac4$  primerekkel inverz PCR-t végeztünk. Az amplifikált P-elem és genomi szekvencia szekvenálásával kiderült, hogy az  $Rpt1^{05643}$ , az  $Rpt1^{k11110}$  és az  $Rpt1^{l(2)SH0675}$  integrációk az *Rpt1* gén 5' nem-transzlált régiójának 31. és 32. bázispárja közé történtek. Az  $Rpt1^{k11110}$  és  $Rpt1^{l(2)SH0675}$  lacW elemek közül az  $Rpt1^{l(2)SH0675}$  elem 3' vége az *Rpt1* ORF felé orientálódik, az  $Rpt1^{k11110}$  elem ehhez képest ellenkező irányultságú. Az  $Rpt1^{EP(2)2153}$  inszerció az *Rpt1* gén 5' nem-transzlált régiójának 22. és 23. bázispárja között foglal helyet. A  $P\{EP\}$  elem az élesztő Gal4 transzkripció faktor célszekvenciáját, az UAS-t 14 kópiában tartalmazza az elem 3' végén<sup>154</sup>. Szintén itt található egy *hsp70* promoter, amelyről induló transzkripció hatékonyságát az UAS-re kötődő Gal4 többszörösére fokozza. Az EP elem 3' végéhez megfelelő orientációban közel eső gén transzkripcióját ilyenformán a Gal4 faktor szabályozása alá rendeljük. Az  $Rpt1^{EP(2)2153}$  allél esetén az EP elem 3' vége az *Rpt1* gén 5' nem transzlált régiója felé esik az *Rpt1* transzkripciójának megfelelő irányban. A négy P-elem inszercióra homozigóta állatok fenotípusát vizsgálva kiderült, hogy az  $Rpt1^{05643}$ ,  $Rpt1^{k11110}$  és  $Rpt1^{EP(2)2153}$  allélok recesszív második lárvastádiumú (L2) letalitást, míg a  $Rpt1^{l(2)SH0675}$  allél recesszív bábletalitást eredményeztek. A *Drosophila* embrió anyai hatás következményeképpen igen nagy mennyiségű 26S proteaszómat halmoz fel.

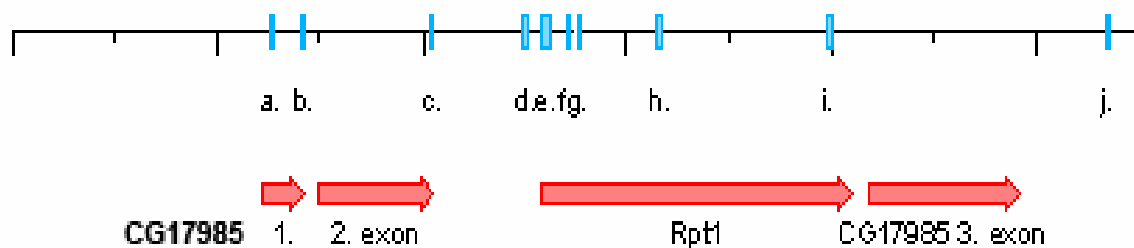
Ennek koncentrációja az egymás után következő lárvastádiumokban fokozatosan csökken, vándorló L3-ban majdhogynem kimutathatatlan<sup>64,100</sup>. A kapott letálfázisok ezzel a folyamattal összeegyeztethetőek voltak.

A bloomingtoni törzsközpontban található egy etil-metán-szulfonáttal (EMS) végzett mutagenézisből származó *RptI* allél, az *RptI*<sup>43Ed-1</sup> is. Ez az allél előzetes adatok alapján<sup>150,151</sup> a fenti négy P-elem inszercióból az *RptI*<sup>05643</sup>-t, az *RptI*<sup>k11110</sup>-t és *RptI*<sup>EP(2)2153</sup>-t nem képes komplementálni. Ez az allél recesszív második lárvastádiumú letalitást mutatott.

A.



B.



### 5. ábra Az *Rpt1* gént tartalmazó genomi régió vázlatos képe és a felhasznált primerek elhelyezkedése

A. Az *Rpt1* gén 5,5 kb-nyi környezete a *CG17985* génnel és a P-elem inszerciók egy részének feltüntetésével. CDS-fehérjekódoló régió. Az mRNS-ben az exonok vastagon jelöltek.

B. A felhasznált primerek elhelyezkedése a vizsgált gének szekvenciáján.

a. far *Rpt1* fwd, b. *CG17985* új fwd, c. *CG17985* új rev, d. *Rpt1* promotor fwd, e. *Rpt1* cDNS fwd, f. *Rpt1* ORF fwd, g. *Rpt1* realt rev, h. *Rpt1* 1/3 rev, i. *Rpt1* rev, j. far *Rpt1* rev



Az *RptI* gén a *CGI7985* gén második intronjában foglal helyet, tehát az *RptI* tulajdonképpen gén a génben (5./A. ábra). Ez megnehezítette a mutáns fenotípusok értékelését, hiszen a nagyjából 11 kb-os integrálódott szekvencia nem csak az *RptI*, de a *CGI7985* funkcióját is károsíthatta. Ezért elhatároztuk, hogy valamilyen módon módosítjuk az allélt, hogy a *CGI7985* mutációjának csökkenjen a valószínűsége. E célból döntöttünk az *RptI<sup>k11110</sup>* P{lacW} elem remobilizálása mellett. A P-elem kivágódása precíz vagy imprecíz módon is végbemehet. A precíz kiugrások a transzpozont nyomtalanul eltávolítják, míg a nem tökéletes kiugrások eredményeképpen a P-elem egyik, másik vagy mindkét vége bennmaradhat az inszerció eredeti helyén, vagy a kiugrás után visszamaradt kettős szálú DNS törést az exonukleázok megtámadhatják és ezáltal deléciót hoznak létre a törés környezetében. A remobilizációhoz második kromoszómás *CyO*, *P{Δ 2-3}* transzpozázforrást használtunk. A *w<sup>+mC</sup>* piros szemet okozó P-elem marker eltűnésére szelektálva 61 db független fehér szemű törzs jött létre. A revertánsokat az *RptI<sup>k11110</sup>* P-elem alléllal komplementáltuk. 45 darab recesszív L2 letális és 13 darab recesszív bábletális, valamint három életképes és fertilis törzset találtunk. Három embrióletális törzset is izoláltunk.

Három bábletális (*RptI<sup>P1</sup>*, *RptI<sup>P51</sup>*, *RptI<sup>P77</sup>*) és három L2 letális (*RptI<sup>L15</sup>*, *RptI<sup>L25</sup>*, *RptI<sup>L45</sup>*) excíziós törzset, valamint az eredeti P-elem inszerciókat (*RptI<sup>05643</sup>*, *RptI<sup>k11110</sup>*, *RptI<sup>l(2)SH0675</sup>* és *RptI<sup>EP(2)2153</sup>*) kereszteztük a régiót lefedő két delécióval (*Df(2R)ED1715* és *Df(2R)ED1725*). A deléciók egy 303 kb-os szakaszon fedtek át a 43E4-F1 citológiai régióban, ahol az *RptI* elhelyezkedik (43E7). A három-három kiválasztott excíziós mutánst két eredeti P-elem inszercióhoz (*RptI<sup>05643</sup>* és *RptI<sup>k11110</sup>*) is bekereszteltük. Ezek a mutációk egyik esetben sem komplementáltak egymást (II. táblázat). Tehát a deléció által lefedett genomrészleten kívül nincs olyan második mutáció, amely a P-elem inszerciók fenotípusát homozigóta formában befolyásolná.

<b>Rpt1 allélok</b>	<b>Homo- zigóták letálfázisa</b>	<b><i>Rpt1</i><sup>05643</sup> felett LF</b>	<b><i>Rpt1</i><sup>l(2)SH0675</sup> felett LF</b>	<b><i>Df(2R)</i> <i>ED1715</i> felett LF</b>	<b><i>Df(2R)</i> <i>ED1725</i> felett LF</b>	<b><i>P1</i> felett LF</b>	<b><i>Rpt1</i><sup>k11110</sup> felett LF</b>
<i>Rpt1</i> <sup>k11110</sup>	L2	L2	L2	L2	L2	báb	
<i>Rpt1</i> <sup>05643</sup>	L2	L2	L2	L2	L2	báb	L2
<i>Rpt1</i> <sup>l(2)SH0675</sup>	báb	L2	báb	báb	báb		
<i>Rpt1</i> <sup>EP(2)2153</sup>	L2	L2	báb	L2	L2	báb	L2
<i>Rpt1</i> <sup>43Ed-1</sup>	L2	báb	kikel	báb	báb	báb	báb
<b>P1</b>	báb	báb	farát adult	L2	L3		
<b>P56</b>	báb	L3/báb		L3	L3		
<b>P78</b>	báb	L2/L3/ báb		fehér báb	báb		
<b>L15</b>	L1/L2	L1/L2	L2/L3	L1/L2	L1/L2		
<b>L25</b>	L1	L2	L2	L1	L1/L2		
<b>L45</b>	L1/L2	L1/L2		L2	L2		
<b>L49</b>	báb	báb	báb	L3	báb		
<b>L51</b>	báb	báb	báb	L3	báb		
<b>L59</b>	báb	báb	báb	L3	báb		

## II. táblázat Az *Rpt1* allélok komplementációs adatai

LF-letálfázis

A *Df(2R)ED1715* és *Df(2R)ED1725* deléciók fölött a *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> EMS mutáns nem a várt második lárvastádiumú letalitást mutatta, hanem bábállapotban pusztult el (II. táblázat). Ez arra enged következtetni, hogy a deléció által kitakart területen kívül van egy, az *Rpt1* allél hatását súlyosbító recesszív letális mutáció. Hasonló eredményt kaptuk akkor, ha a *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> és *Rpt1*<sup>05643</sup>, valamint a *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> és *Rpt1*<sup>k11110</sup> P-elem allélokkal végeztünk komplementációs tesztet. A *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> és *Rpt1*<sup>l(2)SH0675</sup> mutánsok teljes mértékben komplementáltak egymást, azt sugallva, hogy a két mutáció két különböző gén funkcióját érinti.

Négy lárvaletális és nyolc bábletális excíziós mutánsból homozigóta állatokat gyűjtöttünk, és ezekből genomiális DNS-t izolálva arról PCR-rel amplifikáltuk az *Rpt1* gén régióját. Két primer párt is használtunk az amplifikációra (5./B. ábra). Elsőként a látható mobilitásbeli különbségeket kerestük a vad és mutáns PCR termékeket agaróz gélelektroforézis után összehasonlítva. Számos ilyen eltérés találtunk és ezeknek az *Rpt1*-et érintő voltát szekvenálással igazoltuk. A kapott eredmények két csoportba osztották a mutánsokat: az L2 letalitásúakban 250-1000 bp

maradt vissza a P-elem két végéből az eredeti inszerció helyén, míg a bábletálisokban 1-160 bp (III. táblázat). Tehát világos korreláció áll fenn az inszerció mérete és a homozigóták letálfázisa között. 4 lárvaletális törzsből sikerült a vadtól különböző méretű PCR terméket nyerni, ezek közül hármat ellenőriztünk komplementációs tesztben, amelyben nem komplementáltak az eredeti P-elem allélokat. A 10 szekvenált bábletális mutáns közül került ki a három komplementációs tesztben kipróbált törzs, amelyek nem komplementáltak az eredeti P-elem allélokat. A bábletális mutánsok esetében csupán a szekvenálás derítette fel a mutáció mibenlétét, mivel ezeknél nem látszott gélelektroforetikus mobilitás különbség a vad és mutáns PCR termék között.

<b>A P-elem kiugratásból származó törzs neve</b>	<b>A maradék P-elem szekvencia hossza (bp-ban)</b>	<b>Homozigóták letálfázisa</b>
<i>RptI</i> <sup>L15</sup>	600	L2
<i>RptI</i> <sup>L25</sup>	1000	L2
<i>RptI</i> <sup>L45</sup>	250	L2
<i>RptI</i> <sup>L61</sup>	500	L2
<i>RptI</i> <sup>P1</sup>	32	báb
<i>RptI</i> <sup>P9</sup>	33	báb
<i>RptI</i> <sup>P24</sup>	32	báb
<i>RptI</i> <sup>P49</sup>	24	báb
<i>RptI</i> <sup>P51</sup>	160	báb
<i>RptI</i> <sup>P59</sup>	35	báb
<i>RptI</i> <sup>P65</sup>	32	báb
<i>RptI</i> <sup>P77</sup>	30	báb

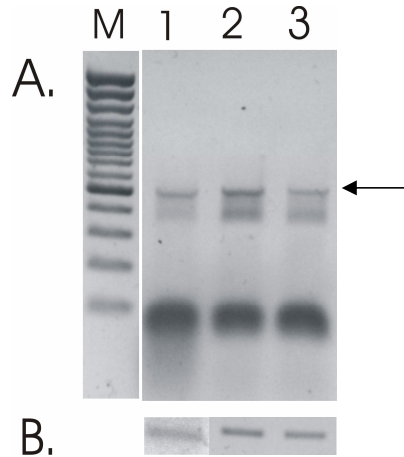
**III. táblázat A P-elem kiugratásból származó törzsek adatai**

A *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> mutációra homozigóta L2 lárvákból genomális DNS-t izoláltunk és PCR-rel amplifikáltuk az *Rpt1* és *CG17985* gént és környezetüket tartalmazó genomi szakaszt. A teljes amplifikált tartomány a *CG17985* gén transzkripció startpontja előtt 1163 bázispárral kezdődött és a gén poliadenilációs helye után 399 bázispárral végződött. Ezt a PCR terméket több különböző primerrel teljes hosszában szekvenáltattuk. A FlyBase-ben (flybase.bio.indiana.edu) megadott teljes *Drosophila melanogaster* genomszekvenciához képest öt különböző bázis esetén találtunk eltérést a *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> mutáns szekvenált genomrészletében. Az öt eltérés közül csupán egy okozott aminosavcserét és még egy érintett mRNS-t kódoló régiót. Az aminosavcserét okozó mutáció az *Rpt1* gén 1255. nukleotidját változtatta G-ről A-ra, ezzel egy glicin→aszparaginsav cserét okozva az Rpt1 fehérje 382. aminosavában. Az mRNS-ben talált változás esetén a *CG17985* transzkript 3' nem kódoló régiójában az 1317. nukleotid cserélődött C-ről A-ra.

A komplementációs tesztek ellenére nem lehattunk benne biztosak, hogy egy *Rpt1*-től különböző gén nem érintett-e az újonnan keletkezett és a már ismert mutánsokban. Ezért az egyes homozigóta *Rpt1* mutánsokat az *Rpt1*-et ektopikusan expresszáló transzgén segítségével próbáltuk menekíteni. Az *Rpt1* teljes kódoló régióját az *Ubi63E* ubiquitin gén enhancer-promotere után klónoztuk és pCaSpeR4 *Drosophila* transzformációs vektorban embriók csíravonalába injektáltuk. A sikeres integrációt a piros szemszín követésével azonosítottuk és a második és harmadik kromoszómájukon markerelt, harmadik kromoszómás inszerciót hordozó legyeket (*w*; *If/CyO*; Pmenekítő/*TM6*) kereszteztük a második kromoszómás *Rpt1* mutációt hordozó törzshöz (*w*;  $\Delta P/CyO, GFP$ ; *MKRS/TM6*). A menekítő konstrukciót és a mutációt is hordozó legyek (*w*;  $\Delta P/CyO$ ; Pmenekítő/*TM6*) szegregáltak olyan utódokat, amelyek a mutációt homozigóta formában, a menekítő konstrukciót pedig egy vagy két példányban hordozták. Ezek az állatok a *Rpt1*<sup>P1</sup> bábletális mutáns esetében kikeltek és fertilisek voltak, tehát ezeknél sikerült helyreállítani az *Rpt1* gén funkcióját a gén ektopikus expressziójával. Ez azt jelenti, hogy a *CG17985* gén nem sérül a *Rpt1*<sup>P1</sup> mutációnál, illetve ha sérül, funkciójának kiesése sem letalitást, sem sterilitást nem okoz. A *Rpt1*<sup>P1</sup>-re homozigóta, egy példány menekítő konstrukcióval menekített legyekből totál RNS-t nyertünk ki, majd ebből cDNS-t készítettünk és azon RT-PCR-t végeztünk olyan primerpárral, amely hosszabb terméket amplifikál az endogén *Rpt1*<sup>P1</sup> cDNS-ről, mint a menekítő *Rpt1* cDNS-ről (*Rpt1* cDNS fwd és *Rpt1*

realt rev, 5./B. ábra)). Ennek segítségével kimutattuk, hogy a menekítő konstrukcióról termelődő mRNS mennyisége körülbelül tízszerese az *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns genomi *Rpt1*-ről képződő mRNS mennyiségének és megfelel a vad típusú légyben jelen levő *Rpt1* transzkript mennyiségének (az adatok nincsenek bemutatva). Az *Rpt1<sup>L15</sup>*, *Rpt1<sup>05643</sup>* és *Rpt1<sup>k11110</sup>* L2 letális mutációkat a felhasznált menekítő konstrukció még homozigóta formában sem menekítette bábállapotnál tovább. Az *Rpt1<sup>05643</sup>* és *Rpt1<sup>k11110</sup>* mutációk transzheterozigótaként két kópia konstrukcióval menekítve bábletalitást mutattak, ahogyan a *Df(2R)ED1715* és *Df(2R)ED1725* deléciók felett menekítve is bábletalisak voltak. Ez a részleges menekítés arra utalhat, hogy az L2 letális törzsekben az *Rpt1* mutációja mellett sérül a *CG17985* gén expressziója és/vagy splicingja is és ezen gén terméke nélkülözhetetlen a *Drosophila* egyedfejlődéséhez. Az *Rpt1<sup>L15</sup>* mutáció több, mint 600 bp P-elem eredetű szekvenciát hordoz, amely, összehasonlítva a *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns 32 P-elem eredetű nukleotidjával, feltehetően megszakítja a *CG17985* gén normális szerkezetét. Az *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* mutációra homozigóta állatok két kópia menekítő konstrukcióval menekítve farát adult stádiumban pusztultak el, de az állatok körülbelül 5%-a képes volt kikelni.

Egy kópia menekítő konstrukcióval részlegesen menekített, *Rpt1<sup>L15</sup>* mutációra homozigóta bábok, valamint homozigóta *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* bábok relatív *Rpt1* mRNS tartalmát kívántuk megvizsgálni annak eldöntésére, hogy egyrészt milyen mértékben sikerült az *Rpt1<sup>L15</sup>* homozigóta mutánsban az *Rpt1* gén hibáját menekíteni, másrészt hogy minek tudható be az *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* mutáns többi P-elem alléltól eltérő fenotípusa. Ehhez azonos mennyiségű *w<sup>1118</sup>* és mutáns bábokból teljes RNS-t izoláltunk és azon reverz transzkripciót végeztünk. A cDNS-eket *Rpt1* ORF fwd és *Rpt1* 1/3 rev *Rpt1* transzkript specifikus primerekkel (5./B. ábra) szemi-kvantitatív PCR-rel amplifikáltuk, a termékeket agaróz gélen futtattuk. A PCR-ekbe bevitt azonos totál cDNS mennyiséget az *RpL23* riboszóma alegység cDNS-ére specifikus primerekkel végzett PCR-rel ellenőriztük. Ezekből a kísérletekből kiderült, hogy a menekített homozigóta *Rpt1<sup>L15</sup>* mutánsban az *Rpt1* mRNS mennyisége kissé magasabb, míg a homozigóta *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* mutánsban körülbelül ugyanannyi, mint a *w<sup>1118</sup>* bábokban (6. ábra). Tehát az *Rpt1<sup>L15</sup>*-ös mutáns menekítése teljes az *Rpt1* génre nézve, vagyis a bábletalitásért egy másik mutáció, feltehetőleg a *CG17985* gén transzkripciójának P-elem maradék általi elrontása felelős. Az *Rpt1* mRNS szint azt jelzi, hogy az *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* mutáció letalitása valószínűleg csupán részben az *Rpt1* gén elrontásának a következménye, a P-elem a *CG17985* génben is okozhat hibát.



**6. ábra Az *Rpt1* mRNS expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel homozigóta *Rpt1* mutánsokban**

M-GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus marker (Fermentas), 1. sáv: *w<sup>1118</sup>* báb RT-PCR, 2. sáv: menekített *Rpt1<sup>L15</sup>* homozigóta báb RT-PCR, 3. sáv: *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* homozigóta báb RT-PCR

**A.** Az RT-PCR-eket azonos koncentrációjú báb cDNS preparátumról készítettük *Rpt1* ORF fwd és *Rpt1* 1/3 rev primerekkel.

**B.** Az RT-PCR-eket azonos koncentrációjú báb cDNS preparátumról készítettük *RpL23* upper és *RpL23* lower primerekkel.

A nyíl a várt nagyságú PCR terméket jelzi.

Az *Rpt1*-et expresszáló menekítő konstrukció egy példányban képes volt bábállapotig menekíteni a homozigóta *Rpt1<sup>43Ed-1</sup>* mutációt. A menekített állatok körülbelül 10%-a képes volt bábból kikelni. Ez, összevetve a *Rpt1<sup>43Ed-1</sup>* azon tulajdonságával, hogy homozigótaként L2 letális, delécio felett pedig bábletális, arra enged következtetni, hogy egy szemiletális háttérmutáció található a *Rpt1<sup>43Ed-1</sup>*-et hordozó kromoszómán. Ennek igazolására *Rpt1<sup>k11110</sup>/Rpt1<sup>43Ed-1</sup>* transzheterozigóta állatokat menekítettünk egy kópia menekítő konstrukcióval. A transzheterozigóták mindegyike kikelt a bábból és fertilis volt a menekítő konstrukció jelenlétében.

Az *Rpt1<sup>EP(2)2153</sup>* mutációra homozigóta állatokban az *Rpt1* gén felé orientálódó *hsp70* promotert UAS szekvenciákon keresztül *daughterless-Gal4* forrással aktiválva az állatok bábállapotig jutottak a fejlődésben, ám nagyon kis részük képes volt bábból kikelni és fertilis volt. Ez a jelenség felveti a lehetőséget, hogy az *Rpt1* gén funkciója ugyan teljesen helyreáll az indukált állatokban, de a *CG17985* gén EP elem által

okozott hibája szemiletális fenotípushoz vezet. Mindezt megerősíti, hogy az *RptI*<sup>l(2)SH0675</sup> mutáns *RptI* mRNS tartalma hasonló a vad típuséhoz, mégis bábletális, menekítve pedig szemiletális fenotípust mutat.

Az *RptI*<sup>05643</sup>, *RptI*<sup>k11110</sup>, *RptI*<sup>l(2)SH0675</sup>, *RptI*<sup>PI</sup> és *RptI*<sup>L15</sup> homozigóta mutánsok, valamint a két kópia menekítő konstrukcióval menekített *RptI*<sup>05643</sup>, *RptI*<sup>k11110</sup> és *RptI*<sup>L15</sup> homozigóta mutánsok letálfázisát 25°C mellett 18°C-on és 30°C-on is meghatároztuk. Alacsonyabb vagy magasabb hőmérsékleten a nem menekített állatok életképessége általában romlott, az *RptI*<sup>05643</sup>, *RptI*<sup>k11110</sup> és *RptI*<sup>L15</sup> mutációk 18°C-on és 30°C-on is L1 letálisnak bizonyultak, a *RptI*<sup>PI</sup> mutáns L3 letálisnak. Az *RptI*<sup>l(2)SH0675</sup> mutáns életképessége egyik hőmérsékleten sem változott. A menekített mutánsoknál a különböző hőmérsékleteken megmaradt a bábletalitás.

További kísérletek során szemikvantitatív módon sikerült megállapítanunk, hogy a *RptI*<sup>PI</sup> bábletális mutánsban a *CG17985* mRNS megközelítőleg ugyanolyan mennyiségben van jelen, mint vad *w*<sup>1118</sup> bábokban (az adatok nincsenek bemutatva). Ehhez azonos mennyiségű *w*<sup>1118</sup> és *RptI*<sup>PI</sup> mutáns bábból teljes RNS-t izoláltunk és azt reverz transzkripciónak vetettük alá. A cDNS-eken *CG17985* specifikus primerekkel (*CG17985* új fwd és *CG17985* új rev, 5./B. ábra) PCR-t végeztünk és a termékeket agaróz gélen futtattuk. A primereket az első és második, illetve az második és a harmadik *CG17985* exon határára terveztük. A termékek azonos méretűek (559 bp) voltak és mennyiségük összehasonlítható volt. Tehát a *RptI*<sup>PI</sup> mutánsban a *CG17985* gén nem sérül, legalábbis az ezzel a módszerrel kimutatható mértékig.

Az egyes *RptI* allélokkal genetikai úton kapott eredményeket a következőkben összegezem.

Az *RptI*<sup>05643</sup> P-elem az *RptI* 5' nem-transzlált régiójának 31. és 32. bázispárja között ül, ez a mutáns recesszív L2 letalitású, bábállapotig menekíthető.

Az *RptI*<sup>k11110</sup> P-elem az *RptI* 5' nem-transzlált régiójának 31. és 32. bázispárja között ül, ez a mutáns szintén recesszív L2 letalitású, bábállapotig menekíthető.

Az *RptI*<sup>l(2)SH0675</sup> P-elem az *RptI* 5' nem-transzlált régiójának 31. és 32. bázispárja között ül, ez a mutáns recesszív bábletalitású, farát adult állapotig, illetve az esetek 5%-ában bábból történő kikelésig menekíthető. Az *RptI* mRNS mennyiség a mutánsban ugyanakkora, mint a *w*<sup>1118</sup> bábokban. Az *RptI*<sup>43Ed-1</sup> és *RptI*<sup>l(2)SH0675</sup> mutánsok teljes mértékben komplementálják egymást.

Az *Rpt1*<sup>EP(2)2153</sup> P-elem az *Rpt1* 5' nem-transzlált régiójának 22. és 23. bázispárja között ül, ez a mutáns recesszív L2 letalitású. A P-elem *Rpt1* ORF felé orientálódó végén elhelyezkedő *hsp70* promoter aktivitását UAS-en keresztül *daughterless-Gal4* forrással fokozva a mutánsok bábállapotig menekíthetők, nagyon kis részük bábból kikel.

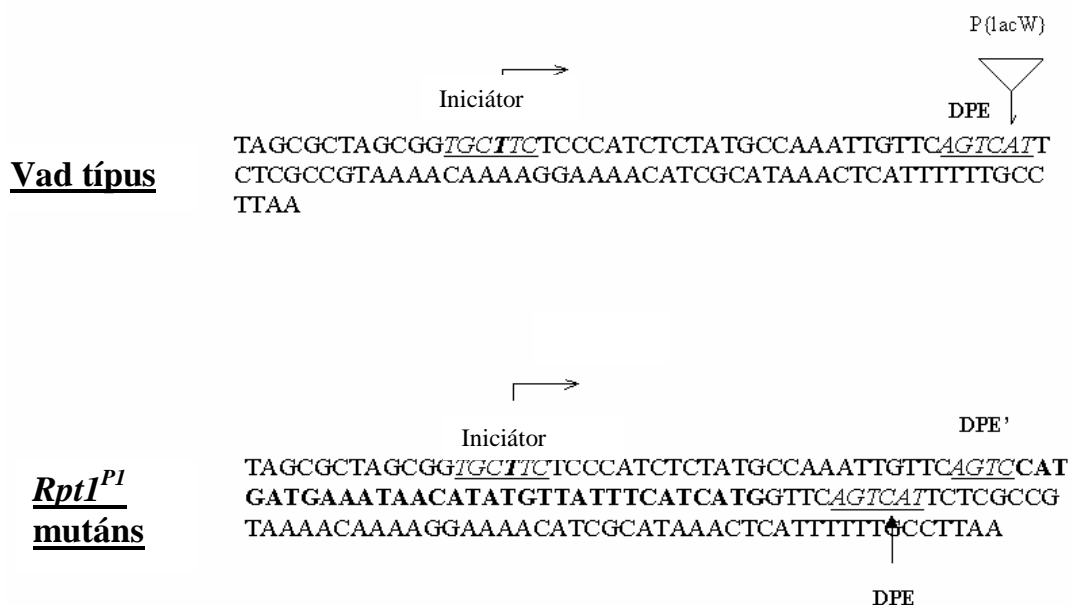
Az *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> pontmutáció az *Rpt1* 1255. nukleotidját G-ről A-ra változtatva okoz az *Rpt1* fehérje 382. aminosavában glicin-aszparaginsav cserét. A mutáns recesszív L2 letalitást, a régiót kitakaró deléción pedig recesszív bábletalitást mutat. A menekített állatok báb állapotban pusztulnak el, de 10%-uk képes bábból kikelni. Az *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> és *Rpt1*<sup>l(2)SH0675</sup> mutánsok teljes mértékben komplementálják egymást. Az *Rpt1*<sup>k11110</sup>/*Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> transzheterozigóták menekítve kikelnek és fertilisek.

Az *Rpt1*<sup>P1</sup> inszerció az *Rpt1*<sup>k11110</sup> P-elemből imprecíz kivágódással keletkezett, 32 bp-nyi P-elem vég maradt vissza az *Rpt1* 5' nem-transzlált régiójának 31. és 32. bázispárja között. A mutáns recesszív bábletalís, menekítve bábból kikel és fertilis. Az *Rpt1*<sup>P1</sup> bábletalís mutánsban a *CG17985* mRNS megközelítőleg ugyanolyan mennyiségben van jelen, mint vad *w*<sup>1118</sup> bábokban.

## II. Az *Rpt1* allélok molekuláris analízise

Minthogy a P-elemek, illetve a remobilizációból származó maradványszekvenciák mind az *Rpt1* 5' nem-transzlált régiójában helyezkednek el, felvetődik a kérdés, miért is okoz a nem kódoló régióban 1-35 bp hozzáadott szekvencia bábletalitást. Ennek megértéséhez szükséges az *Rpt1* promoter szerkezetének ismerete. Az *Rpt1* szorosan vett promotere nem tartalmaz TATA box szekvenciát, hanem a TATA nélküli promoterek egy családjának Inr (iniciátor) és DPE (downstream promoter element) szekvenciáit használja a transzkripció iniciációjára (7. ábra). A *Drosophila* gének több, mint fele nem tartalmaz TATA boxot<sup>119</sup>. Az iniciátor a transzkripció kezdőpontját jelöli ki, a kezdő nukleotidhoz viszonyítva -2-től +4-ig terjed. A DPE +28.-+32. bázispár között található, vagyis a transzkript leendő szekvenciájában. A két elem közötti távolság kritikus a transzkripció hatékonysága szempontjából<sup>119</sup>.





**7. ábra** Az *RptI* gén promoterének szekvenciakörnyezete és a *RptI<sup>P1</sup>* mutáció helye

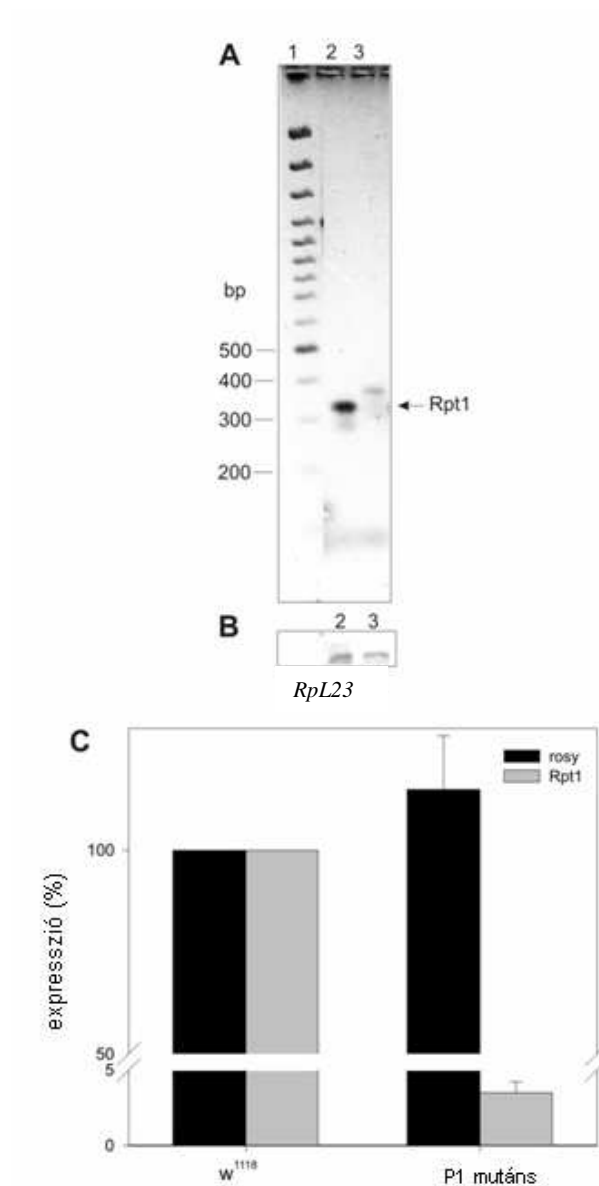
Az ábra felső részén a vad típus, alsó részén a *RptI<sup>P1</sup>* mutáns *RptI* szekvenciájának részlete látható. Dőlt betűvel jeleztem benne az iniciátorszerű szekvenciát és a DPE elemet, vastagított betűvel a P-elem szekvencia maradékát. A transzkripció kezdőpontját nyíl és vastagított dőlt *T* jelzi. A P-elem beugrását háromszöggel és nyíllal jeleztem.

Az *RptI* promoter a DPE konszenzus szekvenciáját tartalmazza a megadott helyen, míg az Inr szekvenciája két nukleotidban tér el az ideálistól, igaz, ezek közül az egyik egy nagyon jellemző dezoxiadenozin a transzkripció kezdőpontján (7. ábra). Az *RptI<sup>05643</sup>*, az *RptI<sup>k11110</sup>* és az *RptI<sup>l(2)SH0675</sup>* P-elemek, amelyek az 5'-UTR-be inszertálódtak, a DPE elem 31. és 32. nukleotidja közé ékelődtek be. Ezáltal a szigorú szekvencia konzervatívusú DPE elem károsodik, ami az alap transzkripciós aktivitás megszűnését kellene, hogy maga után vonja. Csakhogy a P-elemek integrációjakor túlnyúló DNS végek feltöltődése révén a P-elem egyik oldalán előforduló 8 bp-nyi

szekvencia megismétlődik a P-elem másik oldalán is, duplikáció jön létre. Ez az ismétlődés jelen van a *RptI*<sup>k11110</sup> inszerció mindkét oldalán, és ez azt eredményezi, hogy az eredeti P-elem allélban és a kiugrással keletkezett származékokban is a DPE elem teljes szekvenciája megismétlődik a P-elem ORF felé eső oldalán is (7. ábra). Tehát a *RptI*<sup>P1</sup> és az összes másik báb- és lárvális letális excíziós mutáns tartalmazza a DPE-t és az iniciátorszerű szekvenciát is, csupán a P-elem maradéknak megfelelően nagyobb távolság van a kettő között. A nagyobb távolság irodalmi adatok alapján értelemszerűen kisebb transzkripciós hatékonyságot von maga után<sup>119</sup>. Így értelmezhető lenne a báb- és lárvaletális excíziós mutánsok letálfázisa és a bennük található P-elem maradékok hossza közti összefüggés. A kisebb távolság nagyobb, míg a nagyobb távolság kisebb transzkripciós efficienciával jár. Az *RptI*<sup>l(2)SH0675</sup> mutánsban a P-elem inszerció recesszív bábletalitást okoz. Ez ellentmondásban állhatna a többi P-elem allél L2 letalításával, de ebben az esetben valószínűleg a *w*<sup>+mC</sup> (*miniwhite*) gén promoteréről induló transzkripció akár a *w*<sup>+mC</sup> és az *RptI* mRNS-ek egy transzkriptumba történő splicing-ja révén képes lehet az *RptI* kódoló régióig eljutni és erről valamilyen mennyiségű transzkriptumot létrehozni. Így ez nem követheti a távolság növekedésével járó efficiencia csökkenést.

Azért, hogy megvizsgáljuk, hogy egy P-elem szekvencia maradék inszerciója mennyire csökkenti a transzkripciós hatékonyságot az *RptI* génen, szemikvantitatív módon összehasonlítottuk az *RptI* mRNS mennyiségét *w*<sup>1118</sup> és *RptI*<sup>P1</sup> mutáns bábokban reverz transzkripcióval kapcsolt PCR-t használva (8. ábra). A felhasznált, totál RNS-ből visszaírt cDNS mennyiségét az *RpL23* riboszóma alegység cDNS-ére normáltuk. Azonos *RpL23* cDNS koncentráció mellett az *RptI* mRNS koncentráció jelentősen csökkent a *RptI*<sup>P1</sup> mutánsban a vad típushoz képest. A mutánsból készült *RptI* PCR termék 30 bázispárral hosszabb volt, mint a vad típus, ez a P-elem maradék számlájára írható. Mivel szükségesnek mutatkozott ennek a megfigyelésnek egy kvantitatív megerősítése is, kvantitív real-time PCR-t használtunk a *w*<sup>1118</sup> és *RptI*<sup>P1</sup> mutáns bábok *RptI* mRNS tartalmának összehasonlítására (8. ábra). A 18S rRNS-re normált mintákban a relatív *RptI* mRNS koncentráció átlagosan harmincszor kevesebbnek mutatkozott a *RptI*<sup>P1</sup> mutánsban, mint a vad típusban, három pár független RNS preparátumot mérve. Az összehasonlítás kedvéért a mintákban a *rosy* mRNS relatív koncentrációját is megmértük. Ennél nem mutatkozott szignifikáns különbség a vad és mutáns preparátum között. Ez a PCR biztosította továbbá, hogy

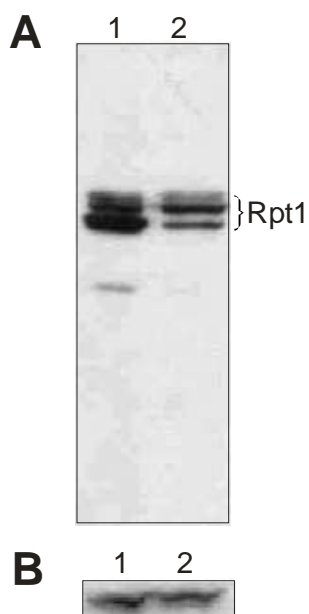
meggyőződünk a genomi DNS hiányáról a cDNS mintákban. Kiderült tehát, hogy a bábletális *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáció az *Rpt1* génnek egy hipomorf allélja.



**8. ábra** Az *Rpt1* mRNS mennyisége lecsökken a *Rpt1<sup>P1</sup>* mutánsban

- A.** 1. sáv: DNS marker (Fermentas), 2. sáv: *w<sup>1118</sup>* RT-PCR termék 3. sáv: *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns RT-PCR termék. Az RT-PCR-eket azonos koncentrációjú báb cDNS preparátumról készítettük *Rpt1* realt fwd és *Rpt1* realt rev primerekkel.
- B.** 2. sáv: *w<sup>1118</sup>* RT-PCR termék 3. sáv: *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns RT-PCR termék. Az RT-PCR-eket azonos koncentrációjú báb cDNS preparátumról készítettük *RpL23* upper és *RpL23* lower primerekkel.
- C.** Real-time PCR eredményeket ábrázoló grafikon. A fekete oszlop a *rosy*, a szürke az *Rpt1* mRNS relatív mennyiségét jelzi a *w<sup>1118</sup>* cDNS felhasználásával kapott értéket 100%-nak véve.

A real-time PCR eredménye felvetette az a kérdést, hogy csupán az *Rpt1* mRNS tartalom, vagy az Rpt1 fehérjetartalom is változik a mutáns esetében. Ezért glükogén foszforiláz mennyiségre normált fehérjepreparátumokon immunoblot analízist végeztünk élesztő Cim5 (Rpt1) elleni poliklonális ellenanyaggal (9. ábra). A preparátumokat *w<sup>1118</sup>* és *Rpt1<sup>PI</sup>* mutáns bábokból készítettük. Azonos fehérjetartalom mellett SDS-PAGE és blottolás után az immunobloton detektált, Rpt1 magasságában reagáló sáv jelentősen vékonyabb volt a mutánsban, mint a vadban. Tehát nemcsak az *Rpt1* mRNS, de a fehérjemennyiség is lecsökken a *Rpt1<sup>PI</sup>* mutánsban.

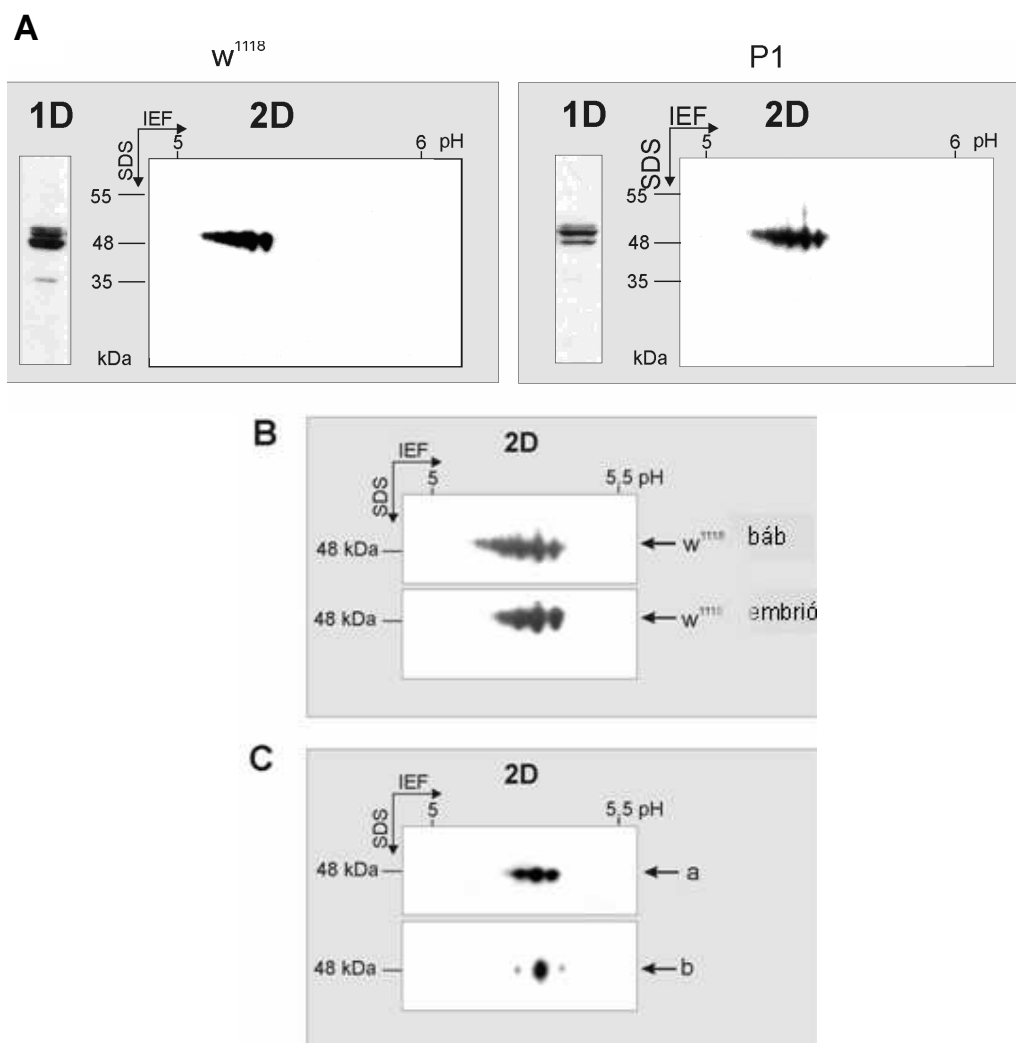


**9. ábra Az Rpt1 fehérje mennyisége lecsökken a *Rpt1<sup>PI</sup>* mutánsban**

1. sáv: *w<sup>1118</sup>*, 2. sáv: *Rpt1<sup>PI</sup>* mutáns. Azonos mennyiségű fehérjét vittünk SDS-PAGE-re (9 %-os gél), blottoltuk és a filtert **A.** anti-Rpt1 poliklonális vagy **B.** anti-glükogén foszforiláz poliklonális ellenanyaggal hívtuk elő.

### III. A *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáció biokémiai következményei

Az Rpt1 specifikus ellenanyag nemcsak egy, de három, egymáshoz közel futó Rpt1 formát ismert fel az immunobloton. Ez mind a vad, mind a mutáns esetében megfigyelhető volt. A kétféle mintában ugyanolyan elektroforetikus mobilitást mutatott a három forma, de relatív intenzitásuk különböző volt. Úgy tűnt, mintha csak a leggyorsabban futó sáv intenzitása csökkenne a mutánsban, míg a másik kettő intenzitása nem változott a vad típusú és *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns preparátumot összehasonlítva. Mivel az emberi Rpt1 foszforilálódik<sup>89</sup>, feltételeztük, hogy ebben az esetben is ezt látjuk. Ennek kipróbálására két dimenziós gélelektroforézisnek vetettünk alá *w<sup>1118</sup>* és *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns bábokból nyert preparátumokat (10. ábra). Az első dimenziót az izoelektromos fókuszálás jelentette, a másodikat az SDS-PAGE. A gélt blottoltuk és anti-Rpt1 ellenanyaggal hívtuk elő. A bloton jól látható volt hat elkülönülő Rpt1 forma, amelyek különböztek izoelektromos pontjukban és egyre csökkenő intenzitással a savas tartomány irányába sorakoztak egymás után. Ez multifoszforiláció jelenlétére utalt.



#### 10. ábra A két dimenziós gélelektroforézis felfedi az Rpt1 foszforilált formáit

A két dimenzió izoelektromos fókuszálás (IEF-pH=4-7) és SDS-PAGE (7 %-os gél) volt. A gél t blottoltuk és anti-Rpt1 poliklonális ellenanyaggal hívtuk elő.

**A.** Bal panel: *w<sup>1118</sup>* bábextraktum, jobb panel: *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns bábextraktum. 1D: SDS-PAGE egy dimenzióban a felhasznált mintával, 2D: kétdimenziós gélelektroforézis.

**B.** Két dimenziós gélelektroforézis *w<sup>1118</sup>* báb és embrió fehérjepreparátum felhasználásával.

**C.** Kezeletlen (a), illetve burgonya savas foszfatázzal kezelt (b) *w<sup>1118</sup>* embrionális fehérjepreparátum képe két dimenziós gélelektroforézis után.

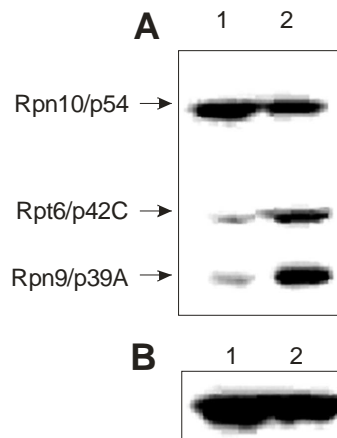
Három típusú foszfatázt próbáltunk ki arra a célra, hogy eltávolítsuk a feltételezett foszforilációt az Rpt1-ről. A borjúbél alkalikus foszfatázzal és a *Pandalus borealis* alkalikus foszfatázzal történő kezelés nem változtatta meg a két dimenziós gélen detektált Rpt1 formák számát és intenzitását. A burgonya savas foszfatázt már

eredményesen használták két proteaszóma alegység defoszforilációjára<sup>152</sup>. Ennek során kimutatták, hogy a defoszforiláció csökkenti a proteaszóma aktivitását. Ezért a burgonya savas foszfatázt is kipróbáltuk az Rpt1 defoszforilációjára. Kísérleteinkben szükségesnek látszott ATP elvonással szétválasztani a regulátor és katalitikus komplexeket, mivel a 20S komplex általi sztérikus takarás megakadályozhatja a foszfatáz működését az Rpt1 alegységen. E célból teljes embrionális fehérjeextraktumot géliszűrünk Sephadex G25 oszlopon, amelyet a burgonya savas foszfatáz reakciópufferével equilibráltunk. A kizárási térfogatban megjelenő fehérjét foszfatáz nélkül inkubáltuk vagy 1 unit/ml koncentrációjú burgonya savas foszfatázzal kezeltük 1 órán át 30 °C-on. A kezelt és kezeletlen mintákból izoelektromos fókuszálásra alkalmas preparátumot készítettünk és két dimenziós gélelektroforézisnek vetettük alá. A második dimenziót blottolva a filtert Rpt1 elleni ellenanyaggal hívtuk elő (10./C. ábra). A kezeletlen minta képe megegyezett a már megismert, embrióban jelenlevő Rpt1 formákkal, a kezelt mintában viszont egy kivételével majdnem teljesen eltűnt az összes Rpt1 forma (10./C. ábra). Ez arra utal, hogy az Rpt1 alegység foszforilálódik.

Megfigyeltük, hogy míg a vad típusban a legbázikusabb, addig a mutánsnál egy ennél savasabb Rpt1 forma volt a legabundánsabb, megerősítve az egydimenziós SDS-PAGE eredményeit (10. ábra). Ez összefüggésben állhat a lecsökkent Rpt1 szinttel a mutánsokban.  $w^{1118}$  embrióval és adult állattal végezve ugyanezt a kísérletet kiderült, hogy míg az adultban található foszforilált formák száma megegyezik a bábban találhatókéval, addig az embrióban kettővel kevesebb helyen foszforilálódik az Rpt1 (10. ábra). Tehát a foszforilációs mintázat egyedfejlődési állapotfüggő az Rpt1 esetében.

Glükogén foszforiláz koncentrációra normálva végeztünk immunoblot analízist  $w^{1118}$  és  $Rpt1^{PI}$  mutáns totál bábextraktumon több proteaszóma alegységre nézve (11. ábra). Bizonyos alegységek relatív koncentrációja megnövekedett a mutáns esetében. A felhasznált monoklonális ellenanyagok egy fedő és több alap alegységre voltak specifikusak. Az Rpn10/S5a/p54 esetén nem beszélhetünk koncentrációnövekedéstől, míg az Rpt6 és Rpn9 alegységek esetében igen. Ez az eredmény megerősíti korábbi megfigyelésünket, miszerint egy regulátor komplex alegység (Rpn10/S5a/p54) deléciója a többi alegység expressziójának koordinált növekedéséhez vezet<sup>100</sup>.



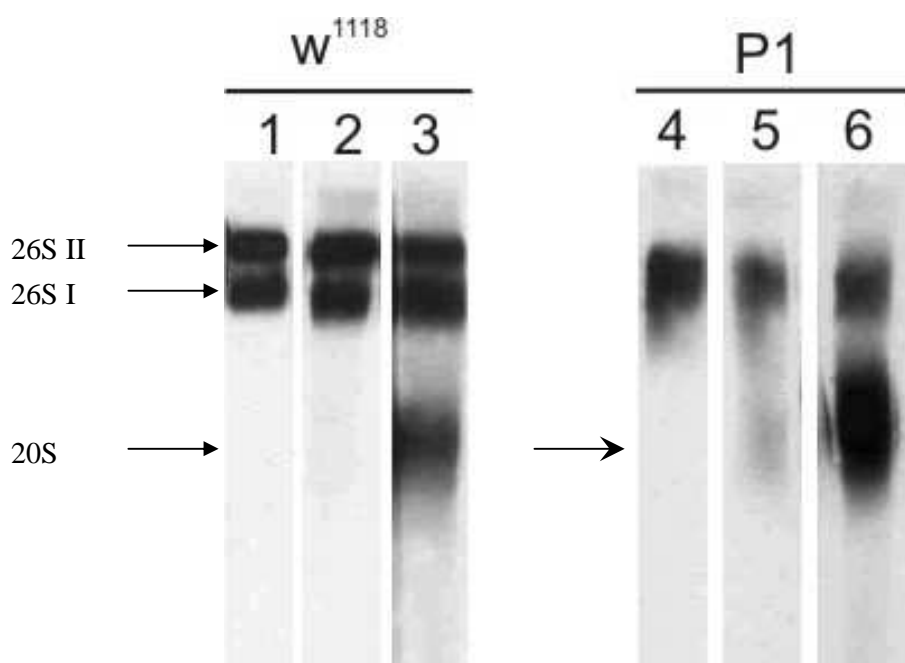


### **11. ábra** Proteaszóma alegységek expressziójának változása a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsban

1. sáv: *w<sup>1118</sup>*, 2. sáv: *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns. Azonos mennyiségű fehérjét vittünk SDS-PAGE-re (8 %-os gél), blottoltuk és a filtert **A.** különböző proteaszóma alegységek elleni monoklonális ellenanyagok keverékével vagy **B.** anti-glükogén foszforiláz poliklonális ellenanyaggal hívtuk elő. Az egyes detektált alegységek neve a sávok mellett olvasható.

Az Rpt1, mint az ATPáz gyűrű tagja, egy interakciós felületet képez a 20S proteaszóma és a regulátor komplex távolabbi alegységei között a 26S proteaszómában. Lecsökkent koncentrációja feltehetőleg zavart okoz a gyűrű összeszerelésében és így akár a 26S proteaszóma formációjában is. A proteaszóma durva összetételének vizsgálatára a leghasznosabb módszer a natív poliakrilamid gélelektroforézis<sup>120</sup>. *w<sup>1118</sup>* és *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns bábokból nyert teljes fehérjeextraktumokat futtattunk 3,8%-os natív, ATP és DTT tartalmú gélen (12. ábra). 1mM ATP és 1mM DTT jelenlétében a 26S proteaszóma szerkezete megmarad a futtatás során. A gél blottolása után a filtert különböző fedő, alap és 20S specifikus ellenanyagokkal reagáltattuk. A vad típusú minta esetén a jól ismert három sávot láttuk az immunoblotoikon: két, egyszeresen (26S I) és kétszeresen (26S II) sapkázott 26S és egy sapka nélküli 20S formát. A szabad 20S mennyisége nem volt több a 26S formáknál, jelezve, hogy a katalitikus komplex döntő része beépül a 26S proteaszómába. A 26S formák reagáltak mindegyik proteaszóma elleni ellenanyaggal. A mutáns minták esetén egészen más képet kaptunk. Itt a jellemző dupla 26S sáv eltűnt, helyette a két sáv mobilitása közötti mobilitású szétkenődött sáv látszott, amely reagált fedő, alap és 20S elleni ellenanyagokkal is. A 20S partikulumok többsége

szabad állapotba került. Ez nagyfokú zavart jelez a 26S proteaszóma összeszerelésében, amely feltehetőleg a lecsökkent Rpt1 koncentrációra vezethető vissza. A kis mennyiségű Rpt1 feltehetőleg teljes, működő 26S proteaszómákat képes létrehozni (noha ezek, bizonyára alacsony koncentrációjuk miatt, a natív gélen nem láthatók), de a nagy feleslegben fennmaradó más alegységek már csak megváltozott szerkezetű formákká állnak össze. A 20S proteaszóma ezek szerint Rpt1 nélkül is képes regulátor komplex alegységekkel komplexeket képezni, de az így keletkezett proteaszómáknak más mobilitása lesz, mint a 26S proteaszómáknak. Felfedezhető továbbá, hogy egy 20S komplexnek megfelelő mobilitású tömeg tűnik fel a mutánsban a fedő elleni ellenanyaggal végzett blotokon hosszabb expozíciókon, amely a részlegesen összeszerelt 19S komplexnek felelhet meg. Vad minták esetén sohasem figyelhető meg szabad regulátor komplex.



**12. ábra** Natív gélelektroforézis *w<sup>1118</sup>* és *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns bábextraktummal

Bal panel: *w<sup>1118</sup>* bábextraktum, jobb panel: *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns bábextraktum

A natív gélelektroforézist (3,8 %-os gél) követően a gél-t blottoltuk és a következő ellenanyagokkal hívtuk elő: 1 és 4.sáv: anti-Rpt6/p42C (alap), 2. és 5. sáv: anti-Rpn9/p39 (fedő), 3. és 6. sáv: anti- $\alpha$ 1 (20S). A jobb panel melletti nyíl az 5-ös sávban előforduló, gyorsan vándorló csíkra mutat.

Immunoblot kísérletekben kimutattuk, hogy azonos glükogén foszforiláz koncentráció mellett a multiubiquitinált fehérjék mennyisége, amelyet anti-ubiquitin ellenanyaggal detektálhattunk, kisebb mértékben megnő a *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns bábban a *w<sup>1118</sup>* bábokhoz képest (13. ábra). Ez bizonyára a 26S proteaszóma funkciójának sérülésére utal, amely a lecsökkent Rpt1 koncentráció következménye.



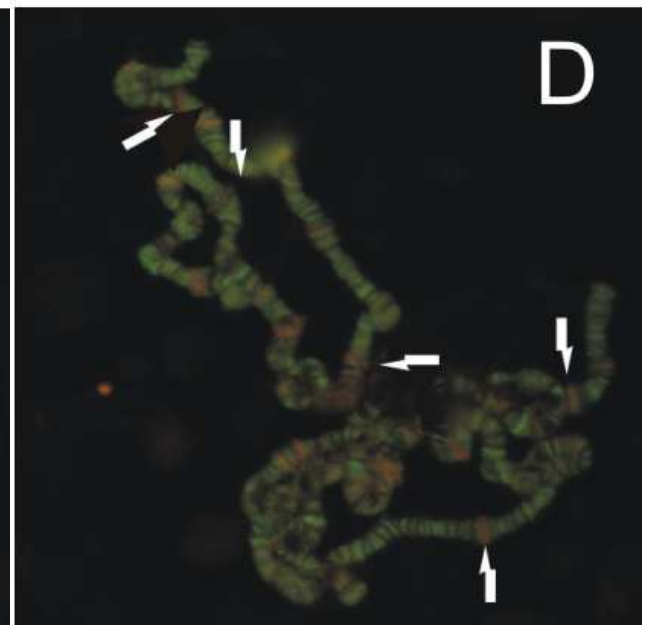
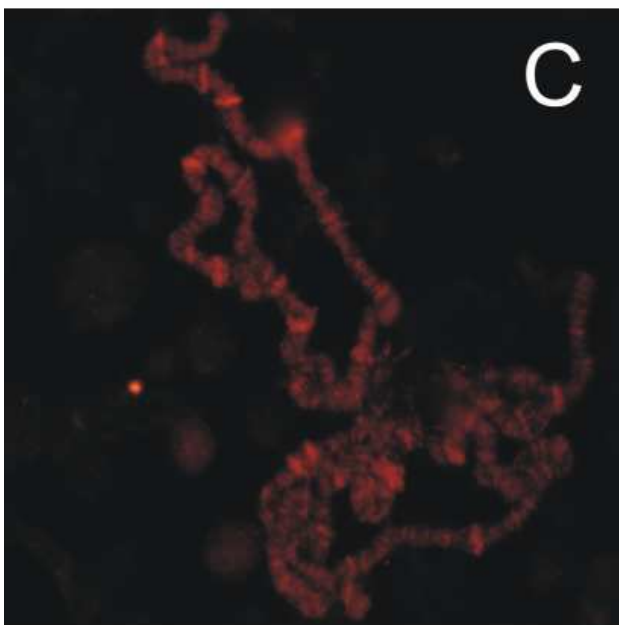
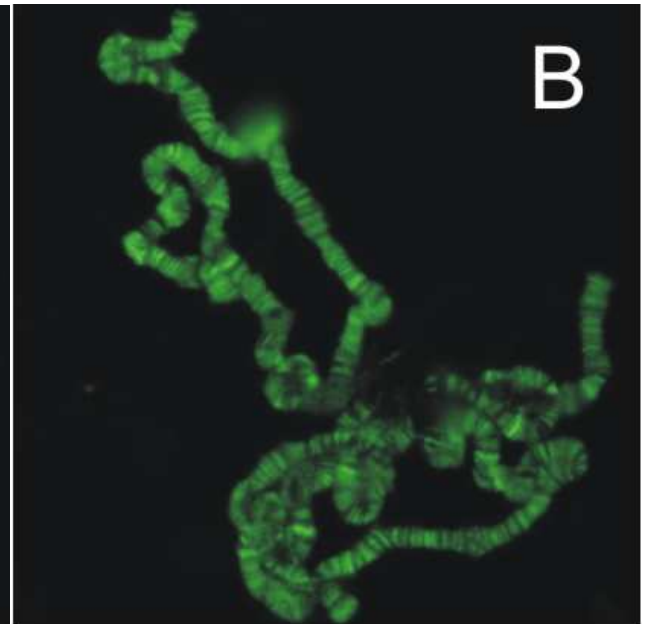
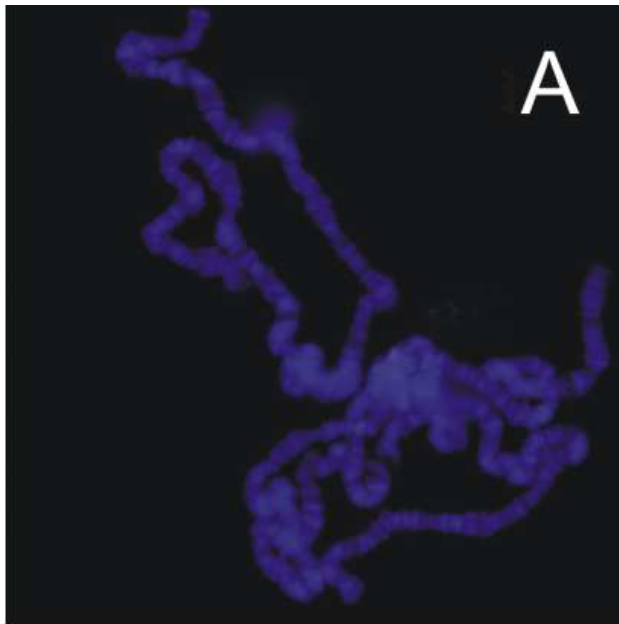
**13. ábra** A multiubiquitinált fehérjék felszaporodnak a *Rpt1<sup>P1</sup>* mutánsban

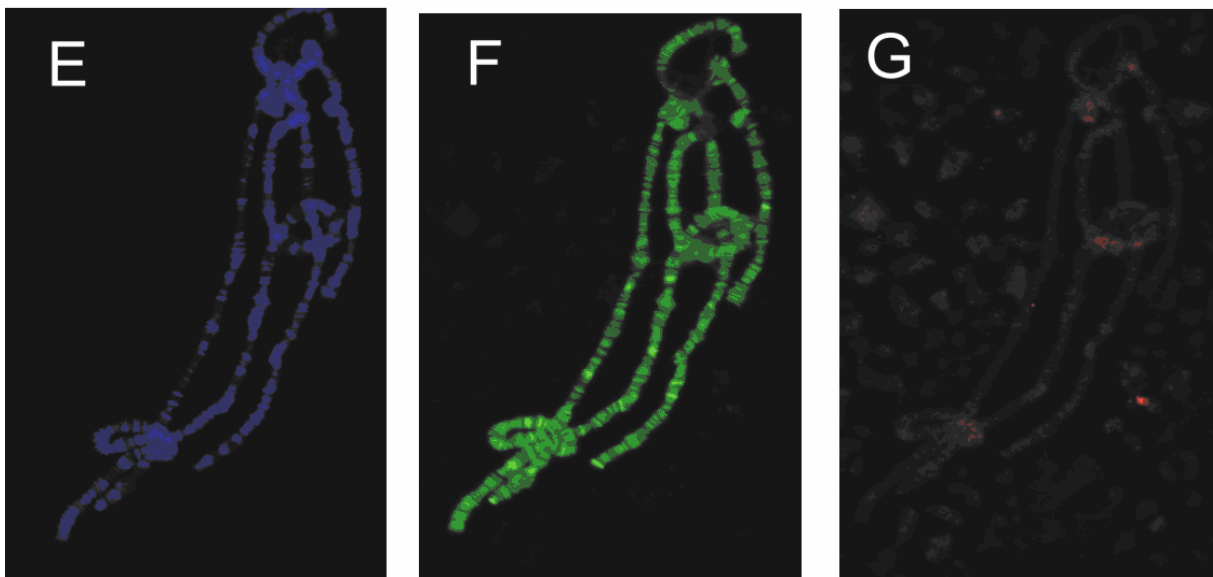
1. sáv: *w<sup>1118</sup>* bábextraktum, 2. sáv: *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns bábextraktum

Azonos mennyiségű fehérjét vittünk SDS-PAGE-re (7 %-os gél), blottoltuk és a filtert **A.** anti-ubiquitin poliklonális ellenanyaggal vagy **B.** anti-glükogén foszforiláz poliklonális ellenanyaggal hívtuk elő.

A regulátor komplex alegységei, különösen az ATPáz gyűrű fehérjéi számos transzkripciót befolyásoló folyamatban vesznek részt a 20S komplex közreműködésével vagy anélkül<sup>77</sup>. Az Rpt1 emberi homológja az Mss1, amelyet a HIV Tat fehérje pozitív modulátoraként írtak le a HIV transzkripció során<sup>76</sup>. Számos ATPáz alegység, köztük az Rpt1 és ortológjai képesek alap transzkripciós faktorokkal

kölcsönhatni, komplexet képezni, amelyben nem figyelhető meg a 20S partikulum<sup>83,84</sup>. Mivel ezek az adatok arra utalnak, hogy az Rpt1-nek transzkripció szerepe is lehet, érdekesnek tartottuk megvizsgálni, hogy *Drosophila*-ban immunofluoreszcens festéssel lokalizálható-e a kromatinhoz. Szintén fontosnak tartottuk azt feltárni, hogy a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsban mennyire asszociálódik a kromatinhoz a csökkent mennyiségű Rpt1 alegység. Vándorló L3-as stádiumú *w<sup>1118</sup>* és *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns lárvákból nyálmirigy óriáskromoszómát preparáltunk és anti-Rpt1 ellenanyaggal megfestettük (14. ábra). A vad típusú lárvákból nyert politén nyálmirigykromoszómán nagyon jól látszott a specifikusan sávokhoz asszociálódott Rpt1 fehérje elleni festés, amely további kísérletek során egyrészt preferenciálisan a transzkripciósan aktív területekhez, a puffokhoz, másrészt a puffon kívüli kromatinhoz tűnt kapcsolódni. Az *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns kromoszómán ez a festés csak nagyon gyengén vagy egyáltalán nem látszott, jelezve azt, hogy a kevés jelenlévő Rpt1 fehérje nem lokalizálódik ezzel a módszerrel kimutatható mértékben a kromatinhoz. Az RNS polimeráz II legnagyobb alegységére is festve a kromoszómát feltűnt, hogy a polimeráz és az Rpt1 az esetek egy részében azonos sávban vagy puffban fordul elő. Mindkettő festette egymással átfedő módon is a kromoszómát, de például az Rpt1 festődés a sávok többségében (60-70%) nem mutatott átfedést az RNS polimeráz II elleni festéssel. Kipróbáltunk más proteaszóma alegységek elleni ellenanyagokat is kromoszómafestés céljából, de a kapott festődés nem volt egyértelmű.



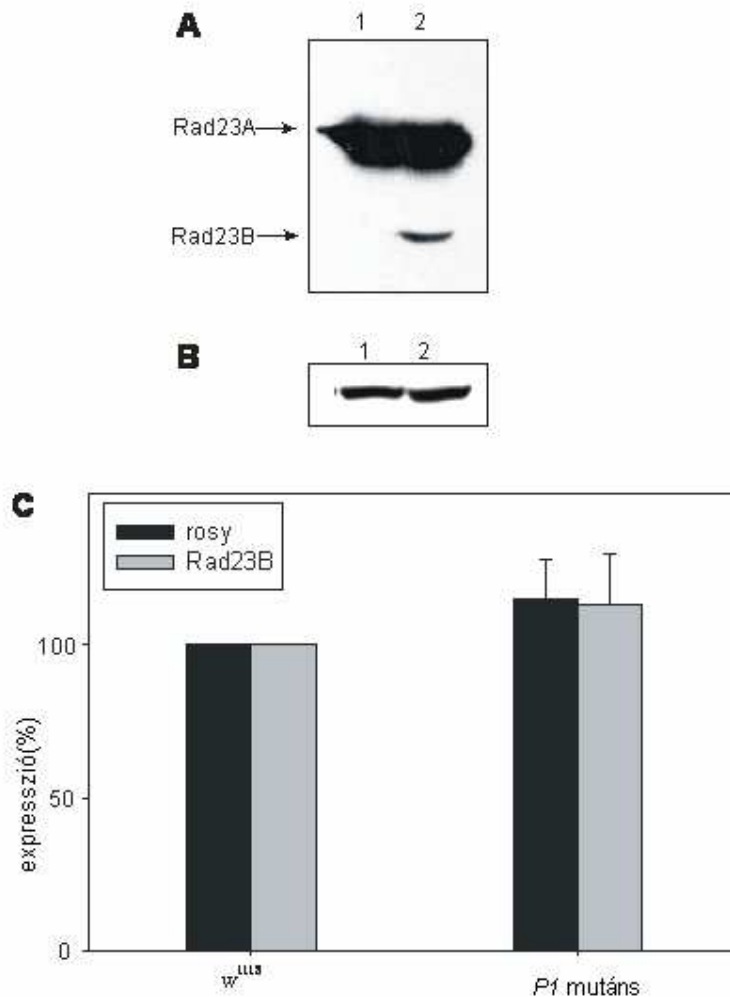


**14. ábra Az Rpt1 kötődik a nyálmirigy óriáskromoszóma speciális kromatinsztruktúráihoz**

Az A,B,C,D ábrák (59. oldal)  $w^{1118}$  lárvák nyálmirigykromoszómáit, az E,F,G ábrák  $Rpt1^{PI}$  mutáns lárvák nyálmirigykromoszómáit ábrázolják. Az A és E ábrák DAPI festést mutatnak, a B és F ábrák az RNS polimeráz II legnagyobb alegysége elleni monoklonális ellenanyaggal lettek festve, a C és G ábrák pedig anti-Rpt1 monoklonális ellenanyaggal történt festést mutatnak. A D ábra a B és C ábrák egymásra csúsztatása („merge”). A nyilak a puffot mutatják, ahol az anti-Rpt1 erősebben fest az anti-RNS polimeráz II-nél.

A lecsökkent Rpt1 szint nem csupán a szorosan vett, többé-kevésbé ismert proteasómális struktúrákat és funkciókat változtatta meg a sejtben. A Rad23 fehérje a proteasóma egyik szubsztrátszállító molekulája<sup>35</sup>. A Rad23 két, alternatív splicing útján keletkezett izoformában van jelen a *Drosophila*-ban. Ezeket a FlyBase A és B formaként tartja nyilván, melyeket nem szabad összetéveszteni az emberi A és B formákkal, amelyek két külön gén termékei. A *Drosophila* A forma egy N-terminális UBL és két C-terminális UBA doménnel rendelkező, teljes Rad23 fehérje, mely feltehetőleg képes funkcióját ellátni és ismert, hogy az Rpn10/p54-et, valamint a multiubiquitínált fehérjéket köti (Lipinszki Zoltán, nem publikált eredmények). A B forma az A-nak egy csonkolt változata, csupán az N-terminális UBL domén hiányzik róla. A többi szekvencia teljesen megegyezik a Rad23A-éval. Az UBL domén

biztosítja a proteaszómához, jelen esetben az Rpn10/p54-hez történő kötést, tehát feltehető, hogy a Rad23B nem képes a proteaszómán kötődni. Egy általunk készített Rad23A elleni poliklonális ellenanyag képes felismerni a bakteriálisan expresszált Rad23B-t. Ennek ellenére ha azonos mennyiségű, glükogén foszforiláz tartalomra normált  $w^{1118}$  és  $Rpt1^{PI}$  mutáns bábextraktumot SDS-PAGE-nek vetettünk alá és blottolás után reagáltattuk a Rad23A elleni szérummal, a  $w^{1118}$  minta esetén csupán a Rad23A látszott az immunoblotton, a B forma detektálhatatlan maradt (15. ábra). A  $Rpt1^{PI}$  mutáns minta esetében viszont mindkét formának megfelelő magasságban kaptunk jelet (15. ábra). A Rad23A forma így is sokkal abundánsabb volt, mint a B, de mind a két forma kimutatható volt. Természetesen elképzelhető, hogy nem a Rad23B fehérjét, hanem a Rad23A egy proteolitikus termékét detektáltuk, de a termék koncentrációja nem változott 25 °C-on történő egy órás inkubáció alatt az  $Rpt1^{PI}$  mutáns fehérjeextraktumban, a vad típusban pedig nem jelent meg. Vagyis valószínűtlen, hogy a Rad23A degradációjából származna a kisebb immunreaktív forma. Tehát valószínűleg a Rad23B fehérje feldúsul a  $Rpt1^{PI}$  mutánsban a vad típushoz képest. Ennek oka többféle lehet, például a Rad23 gén splicingja változik meg, nő a Rad23B mRNS transzlációs efficienciája vagy csökken a Rad23B fehérje degradációjának mértéke. Ennek eldöntésére szemikvantitatív reverz transzkripció kapcsolt PCR-t és kvantitatív real-time PCR-t használtunk az  $Rpt1$  transzkriptumnál leírt módon (15. ábra). A szemikvantitatív módszernél kapott eredményt, miszerint a  $Rad23B$  érett mRNS mennyisége ugyanakkora a  $Rpt1^{PI}$  mutánsban, mint a  $w^{1118}$  bábban, megerősítette a cDNS-eken végzett real-time PCR is. Tehát a  $Rpt1^{PI}$  mutáció csak a Rad23B fehérje keletkezésének vagy lebontásának ütemét befolyásolhatja. Minthogy a Rad23 az ubiquitin-proteaszóma rendszer része és legalábbis az A forma kölcsönhat a proteaszómával, valószínűbbnek tűnik, hogy a vad típusú bábban a proteaszóma bontja a Rad23B-t és a  $Rpt1^{PI}$  mutáció zavart okoz a Rad23B degradációjában.



**15. ábra A Rad23B fehérje feldúsul a  $Rpt1^{PI}$  mutánsban, míg kódoló mRNS-e nem**

**A és B.** 1. sáv:  $w^{1118}$  bábextraktum, 2. sáv:  $Rpt1^{PI}$  mutáns bábextraktum

Azonos mennyiségű fehérjét vittünk SDS-PAGE-re (9 %-os gél), blottoltuk és a filtert **A.** anti-Rad23 poliklonális ellenanyaggal vagy **B.** anti-glükogén foszforiláz poliklonális ellenanyaggal hívtuk elő.

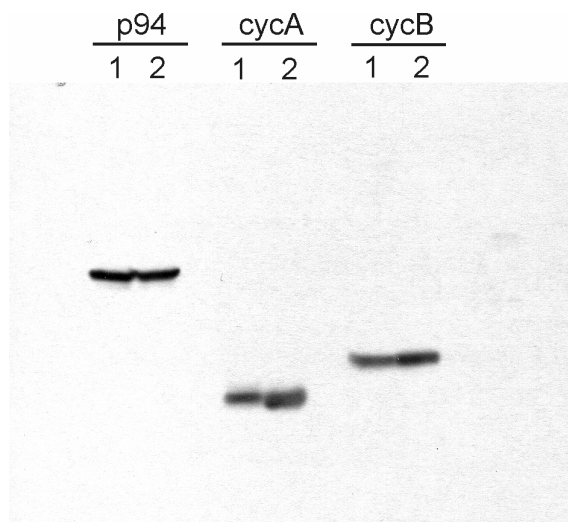
**C.** Real-time PCR eredményeket ábrázoló grafikon. A fekete oszlop a *rosy*, a szürke az *Rad23B* mRNS relatív mennyiségét jelzi a  $w^{1118}$  cDNS felhasználásával kapott értéket 100%-nak véve.



#### IV. A *Rpt1*<sup>P1</sup> mutáns mitotikus jellemzői és genetikai interakciói

A *Saccharomyces cerevisiae* Rpt1 ATPáz doménjének pontmutációja a sejtciklus G1 fázisában történő megállást okozott<sup>70</sup>. Azonban a gén olyan mutációja, amely egy léziót okoz a kódoló régióban<sup>86</sup>, G2/M fázisban való megállást és nagyon lassú növekedést<sup>85</sup> váltott ki ugyanebben az élőlényben. Ezeknek az adatoknak a fényében kíváncsiak voltunk, mutat-e valamilyen mitotikus kromoszómaaberrációt a *Rpt1*<sup>P1</sup> mutáns, vándorló 3. stádiumos lárvákból készített neuroblaszt preparátum. Az agyakat kiboncolva 3% aceto-orceinnel festettük és szétnyomtuk őket fedőlemez és tárgylemez között. Nem találtunk semmiféle megfigyelhető kromoszóma rendellenességet az agypreparátumokban, sem a mitotikus index növekedését, ami azt engedi sejtetni, hogy a *Rpt1*<sup>P1</sup> mutánsban nincsen blokk a mitózisban.

A mitotikus blokk jellemzően a mitotikus ciklinek (ciklinA és B) felszaporodásával jár együtt, amely csökkent proteaszómális degradációjuknak tudható be. Glükogén foszforiláz (p94) tartalomra normálva a géltre vitt fehérjemennyiségeket Western bloton kimutattuk, hogy a ciklinA mennyisége enyhén megnő, míg a ciklinB mennyisége nem változik a mutánsban a vad típushoz képest (16. ábra). A *Rpt1*<sup>P1</sup> mutáció tehát, ha okoz is sejtcikluszavart, azt a mitózis bekövetkezte előtt teszi.



### **16. ábra A mitotikus ciklinek koncentrációja a *RptI<sup>Pl</sup>* mutánsban**

1. sáv: *w<sup>1118</sup>* bábextraktum, 2. sáv: *RptI<sup>Pl</sup>* mutáns bábextraktum

Azonos mennyiségű fehérjét vittünk SDS-PAGE-re (7 %-os gél), blottoltuk és a filtert különböző ellenanyagokkal hívtuk elő.

p94-anti-glükogén foszforiláz ellenanyag, cycA-anti-ciklinA ellenanyag, cycB-anti-ciklinB ellenanyag

Feltételeztük, hogy genetikai interakció jöhet létre az *RptI<sup>Pl</sup>* mutáns és különböző proteaszóma és APC/C alegység mutációk között. Egy proteaszóma alegység mutációt ( $\Delta Rpn10/S5a/p54$ ) és két APC/C alegység mutációt (*shd<sup>1</sup>* és *mks<sup>1</sup>*) teszteltünk az *RptI<sup>Pl</sup>*-gyel párosítva. Szinergisztikus recesszív genetikai interakciót sikerült kimutatnunk mind a *RptI<sup>Pl</sup>* és  $\Delta Rpn10/S5a/p54$  (*Rpn10/S5a*) mutánsok, mind a *RptI<sup>Pl</sup>* és *mks<sup>1</sup>* mutánsok között. A *mks<sup>1</sup>* (*mákos*) az APC/C Cdc27 alegységének hipomorf mutációja<sup>118</sup>, amely farát adult letális. A  $\Delta Rpn10/S5a/p54$  az eredeti cikkben leírt<sup>100</sup>, három gént érintő deléción kívül egy kromoszómára rekombinálva tartalmazza a két, nem *Rpn10/S5a/p54* gént visszapótló menekítő transzgént (Deákné Pál Margit, nem publikált eredmények). Ez a mutáció bábletális. A *RptI<sup>Pl</sup>/RptI<sup>Pl</sup>*;  $\Delta p54/\Delta p54$  állatok 90%-a a harmadik lárvastádium elején, 10%-a vándorló L3-as lárvaként elpusztult. A *RptI<sup>Pl</sup>/RptI<sup>Pl</sup>*; *mks<sup>1</sup>/mks<sup>1</sup>* állatok fele elpusztult vándorló L3-as lárvaként, felénél pedig fehérbáb állapot után lizálódott a beltartalom és kiüresedtek. Mindkét genotípusnál 8-10 napos L3-as stádium volt megfigyelhető a szokásos 3 nap helyett. Domináns interakciót nem tapasztaltunk a mutánsok között. Más proteaszóma alegység gének P-elem alléljai is vizsgálhatók interakciós tesztben az *RptI<sup>Pl</sup>* mutánssal, ezeknek részletesebb analizisére még nem került sor.

## Az eredmények tárgyalása

A 19S regulátor komplex egyes alegységeinek egyedi vizsgálata végigkísérte a proteaszóma történetét a 1990-es évek elejétől kezdve. Így fedezték fel az S5a/Rpn10/p54 multiubiquitinlánc kötő képességét, így cáfolták meg az ATPázok redundanciáját és az Rpn11 deubiquitináló aktivitására is így derült fény. Azonban csak néhány alegységről ismert, hogy miért esszenciális tagja a proteaszómának, bizonyos alegységek egyedi funkciójáról pedig semmit sem tudunk. A fedő alegységek közül részletesen csak az Rpn11 funkciója ismert. Sarjadzó élesztőben a legtöbb alegységet vizsgálták már genetikai módszerekkel, de kevés individuális, csak az alegységre jellemző vonást tártak fel ezek a vizsgálatok<sup>121-130</sup>. Többsejtű eukariótákban pedig alig akad példa a 19S alegységek genetikai analízisére. Az utóbbi években *Drosophila* S2 sejttenyészeteken proteaszóma alegységek elleni RNS interferencia alkalmazásával próbálkoztak<sup>88,104,131,132</sup>. A genetikai vizsgálatokból legtöbbször az derül ki, hogy az adott alegység szükséges a regulátor komplex stabilitásához, hiányában felszaporodnak a multiubiquitinált fehérjék, sejtciklusblokk, növekedési zavar, apoptózis következik be. A proteaszóma szétesik ezekben a mutásokban, jelezve az egyes alegységek szerepének fontosságát a struktúra kialakításában.

A regulátor komplex fő funkciói, amelyek nagyon is szerteágazóak és gyaníthatóan sok alegység koordinált működését igénylik, jól kapcsolhatók a komplex alap és fedő alkomplexeinek valamelyikéhez. A fedő alkomplex (ezen belül az Rpn11) biztosítja a belső deubiquitináló aktivitást, az alap alkomplex végzi a multiubiquitinált fehérjék felismerését (Rpn10/S5a/p54 és Rpt5/S6'), a kitekerésüket (ATPáz gyűrű együttműködése), a 20S  $\alpha$ -alegységek kapuzását (Rpt2) és a 20S csatornájába a kitekert polipeptidlánc beletáplálását (ATPázok). Mint látható, a legtöbb folyamathoz hozzárendelhető egy vagy több alegység, amely elengedhetetlen az adott folyamat végbemeneteléhez. A fedő és alap alkomplexek mesterséges szétválasztásával sikerült tisztázni, melyik alkomplexnek megközelítőleg mi a funkciója, de ezt kevés esetben sikerült alegységek szintjére szűkíteni. Az eukarióta ATPáz gyűrű összetételének szerepét még nem értettük meg teljesen, hiszen noha behatóan vizsgálták már *Archaeobacterium*-okban az ott fellelhető ATPáz komplex

funkcióit, ez mégsem ad magyarázatot arra, hogy miért is kell hat különböző ATPáz az eukariótáknak. A PAN, a *Methanococcus jannaschii* ATPáz komplexe csupán egyféle fehérjéből áll és ez a megfigyelések szerint minden egyes eukarióta ATPáz gyűrű funkcionának megfelelő prokarióta folyamatot tökéletesen véghez tud vinni<sup>73,133-136</sup>. Ma ez az archaebakteriális rendszer a legjobb modellje az ATPázok működésének. Így derült ki például, hogy a megfelelő felismerőszekvenciával rendelkező fehérjét a PAN kitekeri és a felismerőszekvencia felőli polipeptid terminálissal kezdve bejuttatja a 20S komplexbe, miközben az ATPáz komplex saját nyílásán keresztülhúzza a kitekert fehérjét<sup>73,134,135</sup>. ATP analógokkal végzett kísérletek kimutatták, hogy az ATP hidrolízis csupán a szubsztrát kitekeréséhez kell, a nem hidrolizálható ATP analógok kötéskor zavartalanul végbemegy a 20S-PAN összeszerelődése, a 20S csatorna kapuzása és egy már kitekert fehérje bejuttatása a 20S üregébe<sup>136</sup>. Ezeket korábban energiaigényes folyamatoknak gondolták. Ezek az eredmények változatlan formában érvényesek az eukarióták hattagú ATPáz gyűrűjére<sup>136</sup>. Lehetséges, hogy a regulátor komplexen belül lezajló finom átalakulások, a bonyolultabb eukarióta szubsztrátok kitekerésének megannyi lépése és számos ismeretlen, a szubsztrátok kezelését szabályozó folyamat kívánja meg az eukarióta ATPáz alegységek közti különbségeket.

A *Drosophila* proteaszóma genetikai analízise érthető módon (tekintve a generációs időket és technikai szükségleteket) sokkal kevésbé elterjedt, mint a két élesztőé<sup>100,126,138-140</sup>. A proteaszómát érintő genetikai kutatásokban azonban a *Drosophila* fontosságát az adja, hogy többsejtű és fejlődését befolyásolhatják a proteaszóma mutációk. Munkacsoportunk biokémiai úton vizsgálva a *Drosophila* regulátor komplexet eljutott addig a pontig, mikor már az alegységek egyedi tulajdonságainak megismeréséhez szükségessé vált a genetikai megközelítés felhasználása is. Ez vezetett az *Rpt1* mutánsok vizsgálatához.

Finley és munkacsoportjának az ATPáz domén pontmutációival nyert eredményei<sup>70</sup> azt mutatják, hogy az *Rpt1* kivételével az összes ATPáz mutációja G2/M késést okoz. Az *Rpt1* mutációja azonban G1/S-ben vált ki megállást és ezzel egyedülálló eddig a regulátor komplex alegység mutációk között (kivéve az Rpn12-t, amely G1/S és G2/M blokkot is mutat<sup>137</sup>). Ezek a különbségek felvetik azt a kérdést, hogy mi lehet az alegység funkciója. Ezért tehát, amikor P-elem által okozott proteaszóma alegység mutánsokat kerestünk *Drosophila melanogaster*-ben és négy *Rpt1* allélt is találtunk, értelemszerű volt a mutánsok további vizsgálata. Feltételeztük,

hogy valamilyen, magasabbrendűekben nem ismert proteaszómális funkcióra deríthetünk fényt az *Rpt1* alléljainak segítségével. Minthogy *Drosophila*-ban ezt az alegységet csak S2 sejt kultúrában RNS interferenciával<sup>88</sup> vizsgálták, más komplex organizmusokban pedig szintén kevésbé ismert az Rpt1 funkciója, amellet döntöttünk, hogy a mutánsokat részletes analízisnek vetjük alá. Miután meghatároztuk a P-elemek helyzetét, azt találtuk, hogy három ezek közül ugyanabban a pozícióban fordul elő az *Rpt1* gén 5' nem transzlált régiójában. Ez a régió a legtöbb génben a promoterral együtt mutációs forrópont, mivel a P-elemek preferenciát mutatnak az ide történő integrációra. Kiderült, hogy az *Rpt1*<sup>k11110</sup> és *Rpt1*<sup>l(2)SH0675</sup> törzsek P-elemei, mindkettő lacW elem, fordított orientációban épültek be egymáshoz képest ugyanarra a genomi helyre. A két allél fenotípusa viszont nem ugyanaz: az *Rpt1*<sup>k11110</sup> allél második lárvastádiumú (L2) letalitást, míg a *Rpt1*<sup>l(2)SH0675</sup> allél bábletalitást eredményezett homozigóta formában. Ennek magyarázata az lehet, hogy az *Rpt1*<sup>l(2)SH0675</sup> P-elem esetén a P-elem markerként szolgáló *w*<sup>+mC</sup> (*miniwhite*) gén promotere és ORF-je 3' végével az *Rpt1* ORF felé orientálódik. Ezáltal, mint ahogy az más kísérletekben már többször bebizonyosodott, az erről a promoterről induló transzkripció akár a *w*<sup>+mC</sup> és az *Rpt1* mRNS-ek egy transzkriptumba történő átíródása, majd splicing-ja révén is képes lehet az *Rpt1* kódoló régióig eljutni és erről valamilyen mennyiségű transzkriptumot létrehozni. Kísérleteink alapján az *Rpt1*<sup>l(2)SH0675</sup> allélra homozigóta bábokban az *Rpt1* mRNS mennyisége összehasonlítható a vad típusban talált mennyiséggel, ez talán a *w*<sup>+mC</sup> promoter aktivitásának köszönhető. A hibrid *w*<sup>+mC</sup>-*Rpt1* mRNS keletkezését kísérletes módon nem vizsgáltuk. Az *Rpt1* gén tehát az *Rpt1*<sup>l(2)SH0675</sup> mutánsokban valószínűsíthetően csupán kis mértékben sérül, mivel menekítve a bábletális *Rpt1*<sup>l(2)SH0675</sup> törzs eljut farát adult állapotig, illetve kis részben kikelésig. A mutációhoz kötődő bábletalitást feltételezhetően nagyobb részt a *CG17985* gén P-elem általi elrontása okozza.

A *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> mutáció homozigótaként L2 letális, két, az *Rpt1* régiót kitakaró delécio felett viszont rendre bábletálisnak bizonyult. A mutáns állatokban az *Rpt1*-*CG17985* genomi régióban egy pontmutáció található, amely aminosavcserét okoz. Az Rpt1 fehérje 382. aminosava változik glicinről aszparaginsavra. Ennek jelentősége egyelőre még ismeretlen. Transzheterozigóta *Rpt1*<sup>k11110</sup>/*Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> állatokat teljesen lehet menekíteni az *Rpt1* menekítő kontruktta, míg a homozigóta *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup>-et csupán részben, vagyis egy szemiletális háttérmutáció található a *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup>-t hordozó kromoszómán. Másik magyarázat lehet erre a jelenségre az, hogy a *Rpt1*<sup>k11110</sup> P-elem

az *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup>-gyel párosodva kihurkolódik és így közel kerül egymáshoz az Inr és DPE elem, amely eredményes transzkripciót tesz lehetővé. Tervezzük az *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> kromoszómán esetlegesen jelenlévő háttérmutációt rekombinációval eltávolítani a pontmutáns kromoszómáról és vizsgálni a pontmutáció menekíthetőségét és fenotípusát ilyen körülmények között. Amennyiben a pontmutáció letálisnak bizonyul, homológ rekombinációval tervezzük kicserélni a vad genomi *Rpt1* példányt egy helyspecifikusan mutagenizált *Rpt1* példányra, amely guanin→adenin cserét hordoz a gén 1255. nukleotidja helyén. Mivel nagyon kevésbé ismerjük, hogy a proteasómális ATPázok C terminális régiója milyen szerepet tölt be a sejtben lezajló folyamatokban, az *Rpt1*<sup>43Ed-1</sup> mutáció vizsgálata ezzel kapcsolatban értékes információkat nyújthat.

Mivel az *Rpt1* gén a *CG17985* gén második intronjában helyezkedik el, nehezebbé vált a mutáns fenotípusok interpretációja. Minthogy a *CG17985* annotált ugyan, de egyáltalán nem jellemzett és homológjai sem léteznek más magasabbrendűekben BLAST keresések alapján, nem tudtuk előrejelezni, hogy ha ez a gén sérülne a P-elem integrációja által, az hozzájárulna-e a P-elem által okozott fenotípushoz vagy sem. A *CG17985* mRNS igen kis előfordulási gyakoriságú, ezért csupán bábokból sikerült kimutatnunk RT-PCR-rel az általunk használt primerek segítségével, lárvákból nem. Tehát nem tudtuk megmondani, hogy a lárvaletális P-elem inszerciók csupán az *Rpt1* vagy mindkét gén alléljai-e.

Nem volt kizárható továbbá az a lehetőség sem, hogy a *CG17985* FlyBase-ben prediktált splicing sémája nem helytálló és a *CG17985* exonok közé az *Rpt1* egyetlen exonja is splicinggal bekerülhet egy mRNS izoformába, amely így egy N és C terminálisán meghosszabbodott Rpt1 fehérje izoformát kódolhat. Emellett létezik a rövidebb Rpt1 izoforma is. A rövidebb formát immunobloton tudtuk detektálni, míg a hosszabb izoformát nem. RNS szinten nem vizsgáltuk a hosszabb izoforma létezésének lehetőségét. Mindazonáltal a hosszabb izoforma létezését nem cáfoltuk meg az eddig elvégzett kísérleteink során. Ha létezik a hosszabb izoforma, az sok, más fajokban nem lehetséges Rpt1 szabályozási módot vetít elő.

Úgy véltük, hogy az Rpt1 vizsgálata szempontjából hasznos lehet, ha a P-elem imprecíz kivágódásával kis deléciókat hozunk létre. Ezek, amennyiben nem érintenek egy, a *CG17985* intronon belüli fontos szabályozó régiót, nem fogják már zavarni a *CG17985* gén működését, de az *Rpt1*-et súlyosan károsíthatják. Az excíziós törzsek *Rpt1* régióját vizsgálva kiderült, hogy az összes kiugrás, amely nem precíz módon

történt, egy P-elem darabot hagyott maga után a P-elem eredeti helyén. Deléció számos keresési kísérlet után sem találtunk ebben a régióban. Ennek magyarázata az lehet, hogy a deléció előfordulása ennél a P-elem ugratásnál igen ritka és nem vizsgáltunk meg megfelelő számú excíziós törzset.

A szekenciavizsgálatok során kapott eredmények két csoportba osztották a mutánsokat: az L2 letalitásúakban 250-1000 bp maradt vissza a P-elem két végéből, míg a bábletálisokban 1-160 bp. Többszörös ellenőrzés után is embrióletálisnak volt mondható több törzs is, mivel nem találtunk homozigóta kikelő lárvákat. A heterozigóták nem mutattak az *Rpt1* régióban DNS hossz polimorfizmust. Feltehetőleg ezek az allélok több gént érintő, az *Rpt1* környékét lefedő deléciók, amelyek nagyobbak 4,5 kb-nál, a DNS hossz polimorfizmus kimutatására használt távolabbi PCR primer pár távolságánál vagy pedig másodlagos mutációk. Ezeket a törzseket nem vizsgáltuk tovább.

A szekvenált, P-elem visszamaradásokkal járó mutációk deléciókhoz és P-elem allélokhöz keresztezése meggyőzött minket arról, hogy ha van is a P-elem visszamaradáson kívül más mutáció a genomban, annak helye leszűkül az *Rpt1* környéki 303 kb-ra. A második mutáció jelenlétének vizsgálatára az *Rpt1* teljes kódoló régióját az *Ubi63E* ubiquitin gén enhancer-promotere után klónoztuk és pCaSpeR4 *Drosophila* transzformációs vektorban embriók csíravonalába injektáltuk. Ezzel a menekítő konstrukcióval sikerült menekíteni az egyik bábletális mutációt (*Rpt1<sup>PI</sup>*), de a lárvaletális (*Rpt1<sup>L15</sup>*) és az eredeti P-elem (*Rpt1<sup>k11110</sup>*) mutációk menekítve csupán bábállapotig jutottak el. A *Rpt1<sup>PI</sup>* mutánsban a menekítő konstrukció az *Rpt1* mRNS-t körülbelül tízszer nagyobb mennyiségben fejezte ki, mint a *Rpt1<sup>PI</sup>* mutáns *Rpt1* gén, és a menekítő mRNS mennyisége összehasonlítható volt a vad típusú *Rpt1* mRNS mennyiségével RT-PCR adatok alapján. Ha szintén RT-PCR-rel vizsgáltuk az *Rpt1* tartalmat, a menekített, *Rpt1<sup>L15</sup>* mutációra homozigóta állatokban valamivel több *Rpt1* mRNS volt jelen, mint a vad típusban. Tehát az *Rpt1* feltehetően a vad típus szerinti mértékben expresszálódik a menekített *Rpt1<sup>L15</sup>* mutánsban, így a bábletalitás oka gyaníthatóan a *CG17985* gén sérülése. Az *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* mutáció menekítésével és az *Rpt1<sup>EP(2)2153</sup>* homozigóta állatok *daughterless-Gal4*-gyel történő indukciójával nyert szemiletális fenotípus tovább erősíti azt az elképzelést, hogy az *Rpt1* 5'-UTR-ben található P-elemek bábletális vagy szemiletális *CG17985* mutációknak foghatók fel.

Feltételezhetjük tehát, hogy a *CG17985* egy egyedfejlődéshez szükséges gén, melynek mutációja letális vagy szemiletális és az *Rpt1<sup>LI5</sup>*, *Rpt1<sup>k11110</sup>*, *Rpt1<sup>EP(2)2153</sup>* és *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* allélok a *CG17985* génnek olyan mutációi, amelyek ennek funkcióját csorbítják. Mivel a *CG17985* mRNS nagyon kis előfordulási gyakoriságú a lárvákban, nem sikerült sem a vad típusú, sem az *Rpt1<sup>LI5</sup>* és *Rpt1<sup>k11110</sup>* mutációkra homozigóta lárvákban RT-PCR-rel kimutatnunk. Így nem tudjuk, hogy ez a transzkript jelen van-e és milyen mértékben a lárvaletális mutánsokban. A *Rpt1<sup>PI</sup>* mutánsban viszont jelen van, mégpedig a vad típussal megközelítőleg azonos koncentrációban. Tehát csak a *Rpt1<sup>PI</sup>* mutánsról állíthatjuk biztosan, hogy benne a *CG17985* gén nem sérült. Tisztázatlan továbbá, hogy a 600 bp-os *Rpt1<sup>LI5</sup>* P-elem maradék hogy befolyásolhatja a *CG17985* gén expresszióját vagy splicingját az intronban. Arra vonatkozóan vannak irodalmi adatok, hogy intronokban fontos szabályozó szekvenciák lehetnek jelen<sup>153</sup>.

A real-time PCR-rel mért *Rpt1* expresszió adatok kimutatták, hogy a *Rpt1<sup>PI</sup>* mutáns az *Rpt1* gén hipomorf változata. A visszamaradt P-elem szekvencia hossza valamilyen módon befolyásolta a gén expressziójának mértékét. Miután elemeztük a FlyBase-ben jelzett *Rpt1* transzkripció startpont körüli szekvenciákat, úgy tűnt, hogy az *Rpt1* gén Inr (iniciátor) és DPE (downstream promoter element) elemeket használ a transzkripció iniciációjára. A két elem közötti távolság kritikus a transzkripció hatékonysága szempontjából<sup>119</sup>. Az *Rpt1* promoter a DPE konszenzus szekvenciáját tartalmazza a megadott helyen, míg az Inr szekvenciája két nukleotidban tér el az ideálistól, igaz, ezek közül az egyik egy nagyon jellemző dezoxiadenozin a transzkripció kezdőpontján. Ez az „A” minden, az irodalomban található irányított mutagenézis kísérletben esszenciálisnak bizonyult az Inr funkciójához. Tehát az *Rpt1* esetében nem lehet szó ép iniciátorról, csak iniciátorszerű szekvenciáról. A P-elemek közül három, amely az 5'-UTR-be beugrott, a DPE elembe, az *Rpt1* gén 31. és 32. nukleotidja közé ékelődött be. Ezáltal a szigorú szekvencia konzervativizmusú DPE elem károsodik, ami az alap transzkripció aktivitás megszűnését kellene, hogy maga után vonja. Mivel azonban a P-elem inszerció mechanizmusa miatt duplikálódik a DPE elem, az Inr és az új DPE együtt képes lehet a transzkripció iniciációjára. A köztük levő távolság azonban a teljes P-elemek esetén 11 kb-nál nagyobb. Ebben az esetben valószínűleg nincsen transzkripció, kivéve az *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* esetét. A *Rpt1<sup>PI</sup>* mutánsban viszont 32 bp-nyi szekvenciával toldódik csak meg az Inr és DPE közötti távolság. Ez könnyen vezethet egy létrejövő, de a normálisnál gyengébb *Rpt1* transzkripcióhoz. Az *Rpt1<sup>EP(2)2153</sup>* elem az iniciátor és a DPE között helyezkedik el.



Ugyanúgy, mint a többi P-elem inszerció, ez is megszünteti a hatékony transzkripció lehetőségét.

Csoportunk korábbi kísérleteiből tudjuk, hogy a *Drosophila* embrió anyai hatás következményeképpen igen nagy mennyiségű 26S proteaszómát halmoz fel. Ennek koncentrációja az egymás után következő lárvastádiumokban fokozatosan csökken, vándorló L3-ban majdhogynem kimutathatatlan<sup>64,100</sup>. A bebábozódás után megnő az igény a 26S proteaszómára, ezért a bábozódás utáni 4 óra során jelentősen megnő a 26S proteaszóma koncentrációja az állatokban<sup>100</sup>. Ennek létrejöttéhez már a proteaszóma gének transzkripciója kell, tehát feltehetőleg ez az a stádium, ahol egy proteaszóma mutáció letalitást okozhat. A *Rpt1<sup>PI</sup>* mutáns megerősíti ezt a feltevést, mivel bábstádiumban pusztul el, noha bizonyos egyedek (nem több, mint 20%) képesek a farát adult stádium P12 szakaszáig elélni. Ez a továbbélés feltehetőleg erősen függ a környezeti tényezőktől. Vizsgáltuk ezért a különböző hőmérsékletek hatását a különböző *Rpt1* mutánsokra. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a 25 °C helyett 18 vagy 30 °C-on történő inkubáció csökkenti a mutánsok életképességét. Talán az *Rpt1* mutáns proteaszóma érzékeny szerkezete reagál negatívan a hőmérséklet változtatására, előbbre tolva ezzel a mutáns letálfázisát.

A katalitikus komplex lárvális letális pontmutációinak<sup>138-140</sup> letálfázisa nem azonos a  $\Delta Rpn10/S5a/p54$  és a *Rpt1<sup>PI</sup>* mutáns bábletális fenotípusával. Ez talán az anyai katalitikus komplex készletek korábbi kimerülésére utal az egyedfejlődés során. Az *Rpt1<sup>L15</sup>* és a lárvális letális P-elem inszerciók letálfázisa feltételezhetően az *Rpt1* és a *CG17985* közös defektusának köszönhető. A *CG17985* sérülése az *Rpt1* menekítése esetén bábletalitást eredményez az *Rpt1<sup>l(2)SH0675</sup>* és az *Rpt1<sup>L15</sup>* mutáns esetében is. Az *Rpt1* mutáció letálfázisát a *CG17985* menekítése esetén nem határoztuk meg ezeknél a törzseknél. Az *Rpt1* promoter teljes elrontása miatt feltehető, hogy az *Rpt1<sup>L15</sup>* és a lárvális letális P-elem inszerciókban nincsen *Rpt1* transzkript, ezért *Rpt1* nullmutánsok. Az *Rpt1<sup>L15</sup>* nullallél voltát megerősítendő, nem kaptunk terméket homozigóta *Rpt1<sup>L15</sup>* és *Rpt1<sup>L25</sup>* lárvákból *Rpt1* primerekkel RT-PCR-t végezve, míg a vad lárvákból igen (az adatok nincsenek bemutatva). Az *Rpt1* nullallél fenotípusát, mivel az *Rpt1<sup>L15</sup>* mutánsban sérül a *CG17985* gén, nem tudjuk biztonsággal megállapítani. Amennyiben ez második lárvastádiumú letálisnak bizonyulna, biokémiai jellemzése nehézkessé válna a lárvákban található proteaszóma

igen csekély mennyisége miatt. A biokémiai vizsgálatokhoz értékesebb egy hipomorf bábletális mutáns, mint például *Rpt1<sup>PI</sup>*.

Az *Rpt1* mRNS csökkenése mellett fehérjeszinten is észleltünk csökkenést az *Rpt1* szintben *Rpt1<sup>PI</sup>* mutáns esetében immunoblotot alkalmazva. Ennek során kiderült, hogy három *Rpt1* forma is reagál a poliklonális, *Rpt1* elleni ellenanyaggal a bábextraktumban. Kétdimenziós gélen az elkülöníthető formák száma megszorodott, 18 cm-es IF gélen legalább hat darab *Rpt1* immunreaktív foltot figyelhetünk meg a bábban. Ezek egymáshoz viszonyított denzitása eltért a vad típus és mutáns között, a mutánsban az egyik módosított forma kevesebb volt a vad típusban megfigyelhető módosított formánál, de a többi folt (módosítatlan és módosított formák) összevethető volt a mutáns és a vad típus között. Ez a módosítás igen nagy valószínűséggel foszforiláció, mivel alig emeli meg a fehérjék molekulatömegét, de az izoelektromos pontjukat savas irányba erősen eltolja. Annak ismeretében, hogy az emberi *Rpt1* foszforilálódik<sup>89</sup>, foszfátázokkal történő kezeléssel próbálkoztunk és burgonya savas foszfátázzal drasztikusan csökkenteni tudtuk egy kivételével az összes *Rpt1* forma intenzitását. Ez a kísérlet megerősítette az *Rpt1* foszforiláció meglétét. Embriókból és adult állatokból készített kétdimenziós gélek segítségével kimutattuk, hogy míg az adultban a bábbal megegyező számú foszforilált forma van, az embrióban kettővel kevesebb. Tehát a foszforilációk száma fejlődési állapotfüggő, nem kizárt, hogy összefüggésben áll a lebontani kívánt fehérjék jellegével és/vagy a kofaktorok változó jelenlétével és hiányával a fejlődés során. Más adatok is arra utalnak, hogy ATPáz alegységek foszforilációja fontos lehet a 20S és a regulátor komplex kapcsolódásában<sup>143</sup>.

A natív gélelektroforézis során kapott eredmények, miszerint az egyszeresen és kétszeresen sapkázott proteaszómák detektálhatatlanná válnak a *Rpt1<sup>PI</sup>* mutánsban és jelentősen megnő a szabad katalitikus komplex mennyisége a mutáció hatására, valamint a regulátor egysége is megbomlik, arra engednek következtetni, hogy a lecsökkent *Rpt1* szint miatt a kevés *Rpt1* csak kis mennyiségű normál 26S proteaszómát tud létrehozni. *Rpt1* hiányában egyrészt nagyon lecsökken a regulátor komplex és a katalitikus komplex kapcsolódási valószínűsége (tehát megnő a szabad 20S aránya a nagyobb komplex 20S tartalmához viszonyítva), másrészt a regulátor komplex többféle abnormális formája jön létre, amelyek a 20S-hez kapcsolódva másfajta mobilitást okoznak, mint akár az egyszeresen, akár a kétszeresen sapkázott formákéi. A regulátor komplex megváltozott formái, összhangban a szabad 20S

megnövekedett koncentrációjával, szabadon is előfordulnak egy 20S körüli mobilitású sávban hosszabb expozíciókon. Ez a sáv nagyobb mobilitású, mint a szabad regulátor lenne, ráadásul szabad regulátor nincs jelen normálisan a sejtben. Tehát összességében súlyos szerkezeti változások játszódnak le az Rpt1 hiányában, megerősítve az S2 sejteken RNS interferenciával kapott adatokat<sup>88</sup>.

A regulátor komplex alegységek expressziója különböző hatásokra mindig összehangoltan változik meg. Élesztőben ezért az RPN4 transzkripció faktor felel<sup>102</sup>, többsejtűekben pedig ismeretlen ennek mechanizmusa, noha az Rpn10/S5a/p54-nek fontos szerepe van ebben a transzkripció koordinációban<sup>100,104</sup>. Errel utal az, hogy *Drosophilában* a *Rpn10/S5a/p54* delécioja bábletalitáshoz és a többi alegység igen nagymértékű túltermeléséhez vezetett<sup>100</sup>. RNS interferenciával lecsökkentve a Rpn10/S5a/p54 szintet S2 *Drosophila* sejtekben a többi alegység gén transzkripció aktivitásának növekedése figyelhető meg<sup>104</sup>. A *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsban is megfigyelhető más alegységek koncentrációjának növekedése a vad típushoz viszonyítva, noha nem minden alegység expressziós szintje nő meg. Annyi biztos, hogy nem olyan nagy mértékben változnak a koncentrációk, mint a  $\Delta Rpn10/S5a/p54$  báb esetében.

A multiubiquitinált fehérjék felszaporodása a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsban arra utal, hogy a rendellenesen összeszerelődött proteaszóma nem képes arra a katalitikus aktivitásra, amelyre a vad 26S proteaszóma. Tehát a regulátor komplex funkciója, feltehetőleg az általános ATPáz funkciók (kitekerés, kapuzás, betáplálás a 20S-be) sérülnek. De az is feltételezhető, hogy pusztán a szerkezet változása teszi lehetetlenné más alegységek működését. Mivel ez egy hipomorf mutáns, nem feltétlenül következik be a multiubiquitinált fehérjék olyan mérvű felszaporodása, mint a  $\Delta Rpn10/S5a/p54$  mutáns esetén, amelynél szembeszökő ez a jelenség<sup>100</sup>. Minthogy a  $\Delta Rpn10/S5a/p54$  egy ubiquitin receptor nullallélje, érthető a koncentráció növekedés. A *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns esetén a kevés, Rpt1-et is tartalmazó proteaszóma még képes lehet bontani a szubsztrátok jelentős hányadát. Az Armadillo ( $\beta$ -katenin) fehérje mennyisége nemhogy megnő, de drasztikusan lecsökken a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsban (az adatok nincsenek bemutatva). Minthogy ez a fehérje a proteaszóma szubsztrátja, és a várakozás szerint fel kellene szaporodnia a mutánsban, a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáció egy Armadillo feletti szabályozási szintet zavarhat meg, ezzel a várthoz képest ellentétes hatást kiváltva.

A kromoszómafestéssel nyert adatokat értelmezve arra jutottunk, hogy az Rpt1 feltehetőleg más ATPázokkal együtt vagy a regulátor komplex részeként a kromatinon valamilyen funkciót lát el, amelynek valamilyen köze van a transzkripcióhoz. Azok a korábbi megfigyelések, hogy a proteaszómális ATPázok a transzkripcióban szerepet játszanak és az Rpt1 alap transzkripciós faktorokkal komplexet tud képezni, megerősítik ezeket az eredményeket. Ismereteink szerint az irodalomban egyetlen cikk található<sup>141</sup>, amely *Drosophila* óriáskoromoszómán vagy bármely más, jól festhető kromoszómán regulátor komplex elleni ellenanyagokkal nyert festést vagy jelölést tárgyal. Az Rpt1 elleni ellenanyaggal kapott eredmények kiegészítik a kromatin immunprecipitációval nyert eddigi adatokat, valamint régiókhoz lokalizálják a proteaszóma alegységeket. A puffokban kapott erős Rpt1 festődés és az RNS polimerázzal való kolokalizáció még csak sejtetik a transzkripciós szerepet, de további kísérletekkel ez bizonyítható lehet. A polimerázzal nem kolokalizálódó Rpt1 immunreaktív sávok pedig feltehetőleg más DNS függő folyamatokban segédkező proteaszómák helyzetét jelzik. A puffokban az RNS polimeráz festődés kissé diffúz képe a fellazult kromatinstruktúrára utal, de itt jól kivehető az Rpt1 lokális feldúsulása. A gyenge polimeráz festést az erős Rpt1 festéssel párosítva arra juthatunk, hogy az Rpt1-nek a transzkripción túl is lehet szerepe a puffokban, talán a kromonémák ragasztóanyagának lebontása, amellyel a fellazult struktúrát létrehozza. Ezek fényében a bábletalitás oka a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns esetében nem csak a csökkent ubiquitin függő proteolízisben keresendő, hanem a regulátor komplex csökkent chaperonszerű ATPáz gyűrű aktivitásában is, amely a hipotézisek szerint a transzkripció esetén működik. Tehát a letalitás részben valamilyen transzkripciós vagy kromatinszerveződési defektusnak is tulajdonítható. Más proteaszóma alegységek elleni ellenanyagokkal nem sikerült olyan egyértelmű kromoszóma festődést kapnunk, amely Rpt1 ellenanyaggal együtt kettős festést tenne lehetővé. Mivel ez több hipotézis megerősítésében vagy elvetésében segíthetne, szándékunkban áll több más proteaszóma elleni ellenanyagot kipróbálni kromoszómafestésre és a festési technikát finomítani.

A Rad23B fehérje felszaporodása a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns bábban arra enged következtetni, hogy ez a fehérje a vad bábban proteaszómális lebontásnak van kitéve. Minthogy arra nézve hiányosak az ismereteink, hogy a proteaszóma specifikusan egy fehérje riboszómális szintézisét befolyásolná, az viszont több esetben bizonyított<sup>45</sup>, hogy egy fehérje specifikus lebontásában segédkezik, helytálló lehet ez a

következtetés. Az *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsban nem látszott multiubiquitinációra utaló jel, vagyis valamilyen más úton mehet végbe a lebontás.

*Saccharomyces cerevisiae*-ben az *Rpt1* ATPáz domén pontmutációja a sejtciklusban G1/S fázis blokkot okozott, ellentétben az összes többi ATPáz alegység mutációjával, amelyek G2/M késést okoztak<sup>70</sup>. Szintén a *Saccharomyces cerevisiae*-ben az *Rpt1* szekvencia részleges deléciója (*cim5-1*) G2/M megállást okozott<sup>85,86</sup>. Mivel mindkét mutáció az *Rpt1* ORF szekvenciáját érinti, az *Rpt1<sup>Pl</sup>* pedig az *Rpt1* transzkripcióját, kíváncsiak voltunk, mutat-e valamilyen mitotikus kromoszómaaberrációt a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns, vándorló 3. stádiumos lárva neuroblaszt preparátuma. Nem találtunk semmiféle megfigyelhető kromoszómarendellenességet az agypreparátumokban, továbbá nem nőtt meg a mitotikus index sem, ami azt engedti sejtetni, hogy a mutáns sejtekben nincsen a mitózisban blokk. Lehetséges, hogy a hipomorf *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáció nem elég erős ahhoz, hogy az agyban kromoszómarendellenességeket okozzon. A másik magyarázat az lehet, hogy már a mitózis előtt sejtciklusblokkot okoz a mutáció. Ezt erősíti az a tény, hogy a ciklinB mennyisége egyáltalán nem, míg a ciklinA mennyisége csupán kissé emelkedik meg a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsokban. A  $\Delta Rpn10/S5a/p54$  mutáció *Drosophilában* nagyon jellegzetes mitotikus fenotípust mutatott a kromoszómapreparátumokon, vagyis ennek az ubiquitin receptornak a szerepe részben a mitózis folyamán felhalmozódó szabályozó fehérjék lebontása lehet<sup>100</sup>. A kapott eredmények alapján ez az Rpt1-re, legalábbis a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns vizsgálata alapján, nem igaz.

Genetikai interakciót mutattunk ki mind a *Rpt1<sup>Pl</sup>* és  $\Delta Rpn10/S5a/p54$ <sup>100</sup> mutánsok, mind a *Rpt1<sup>Pl</sup>* és *mks<sup>l</sup>* mutánsok között. A *mks<sup>l</sup>* az APC/C Cdc27 alegységének hipomorf mutációja<sup>118</sup>. A kölcsönhatás mindkét esetben szinergisztikus jellegű volt, tehát a mutációk egymás letális hatását erősítették. A *mks<sup>l</sup>* és *Rpt1<sup>Pl</sup>* közötti interakció nehezen értelmezhető, mivel a *Rpt1<sup>Pl</sup>* nem mutat mitotikus fenotípust, ellentétben a *mks<sup>l</sup>*-sal, amelynél ez igen kifejezett. Mindazonáltal az általános proteaszóma funkció elengedhetetlen az APC/C által multiubiquitinált fehérjék degradációjához, ezért a proteaszóma hibája még tovább ronthatja a hibás APC/C által kevésbé multiubiquitinált fehérjék lebontását, tehát összeadódhatnak a negatív hatások. Így értelmezhető a  $\Delta Rpn10/S5a/p54$ -gyel adott interakció is, amely a proteaszóma a két mutáció általi fokozott terheltségét jelentheti és az ilyen módon

megváltozott proteaszóma kevésbé tudja betölteni funkcióját, mint az egyszerűen mutáns proteaszómák.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *Drosophila melanogaster* 26S proteaszómájának, ezen belül is a 19S regulátor komplex egyik alegységének, az Rpt1/p48B-nek genetikai tanulmányozása során sikerült egy hipomorf Rpt1 allélt izolálnunk és ennek segítségével az alegység szerepét vizsgálnunk. A hipomorf *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns vizsgálata során felfedeztük Rpt1 fehérje multifoszforiláltságát, az Rpt1 szerepét a proteaszóma szerkezet kialakításában, az Rpt1 kapcsolódását a kromatinhoz, ennek az alegységnek a szerepét más alegységek expressziójának szabályozásában, az Rpt1 hozzájárulását a Rad23B fehérje lebontásához, valamint a mitotikus blokk hiányát és a multiubiquitinált fehérjék felszaporodását a hipomorf mutánsban. Kevés bizonyíték gyűlt eddig össze arra vonatkozólag, hogy az Rpt1 alegység a proteaszómán belül egyedi funkciókkal bír. A Rad23B felszaporodása és a foszforilációs mintázat alapján feltételezhető az Rpt1/p48B individuális szerepe, azonban ennek részletes tisztázása további vizsgálatokat igényel.

## **Irodalomjegyzék**

1. Hershko A, Tomkins GM. Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. J Biol Chem. 1971 Feb 10;246(3):710-4.
2. Goldspink DF, Goldberg AL. The apparent stimulation of proteolysis by adenosine triphosphate in tissue homogenates. Biochem J. 1973 Jul;134(3):829-32.
3. Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1978 Apr 28;81(4):1100-5.
4. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Jul;76(7):3107-10.
5. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, Hershko A. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. J Biol Chem. 1980 Aug 25;255(16):7525-8.
6. Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. J Biol Chem. 1980 Aug 25;255(16):7529-32.
7. Wilkinson KD, Audhya TK. Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires ubiquitin with the COOH-terminal sequence Arg-Gly-Gly. J Biol Chem. 1981 Sep 10;256(17):9235-41.
8. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. J Biol Chem. 1981 Feb 25;256(4):1525-8.
9. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. J Biol Chem. 1983 Jul 10;258(13):8206-14.
10. Hunt LT, Dayhoff MO. Amino-terminal sequence identity of ubiquitin and the nonhistone component of nuclear protein A24. Biochem Biophys Res Commun. 1977 Jan 24;74(2):650-5.
11. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Hershko A. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. J Biol Chem. 1982 Mar 10;257(5):2537-42.
12. Hershko A. Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. Cell. 1983 Aug;34(1):11-2.

13. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Mar;77(3):1365-8.
14. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Apr;77(4):1783-6.
15. Hershko A, Eytan E, Ciechanover A, Haas AL. Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J Biol Chem*. 1982 Dec 10;257(23):13964-70.
16. Hershko A, Leshinsky E, Ganoth D, Heller H. ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Mar;81(6):1619-23.
17. Rose IA, Warms JV. An enzyme with ubiquitin carboxy-terminal esterase activity from reticulocytes. *Biochemistry*. 1983 Aug 30;22(18):4234-7.
18. Pickart CM, Rose IA. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J Biol Chem*. 1985 Jul 5;260(13):7903-10.
19. Goldberg AL, Boches FS. Oxidized proteins in erythrocytes are rapidly degraded by the adenosine triphosphate-dependent proteolytic system. *Science*. 1982 Feb 26;215(4536):1107-9.
20. Rechsteiner M. Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu Rev Cell Biol*. 1987;3:1-30.
21. Fang S, Weissman AM. A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Jul;61(13):1546-61.
22. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jan;6(1):9-20.
23. Castro A, Bernis C, Vigneron S, Labbe JC, Lorca T. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene*. 2005 Jan 13;24(3):314-25.
24. Varshavsky A. Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci*. 2005 Jun;30(6):283-6.
25. Varshavsky A. The early history of the ubiquitin field. *Protein Sci*. 2006 Mar;15(3):647-54.
26. Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*. 1984 May;37(1):43-55.
27. Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*. 1984 May;37(1):57-66.



28. Kirkpatrick DS, Hathaway NA, Hanna J, Elsasser S, Rush J, Finley D, King RW, Gygi SP. Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol.* 2006 Jul;8(7):700-10.
29. Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem.* 1994 Mar 11;269(10):7059-61.
30. Hartmann-Petersen R, Gordon C. Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Apr;15(2):247-59.
31. Andersen KM, Hofmann K, Hartmann-Petersen R. Ubiquitin-binding proteins: similar, but different. *Essays Biochem.* 2005;41:49-67.
32. Hiyama H, Yokoi M, Masutani C, Sugasawa K, Maekawa T, Tanaka K, Hoeijmakers JH, Hanaoka F. Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):28019-25.
33. Saeki Y, Sone T, Toh-e A, Yokosawa H. Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 30;296(4):813-9.
34. Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, Feng MT, Tubing F, Dittmar GA, Finley D. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):725-30.
35. Elsasser S, Finley D. Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):742-9.
36. Miller RD, Prakash L, Prakash S. Defective excision of pyrimidine dimers and interstrand DNA crosslinks in *rad7* and *rad23* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 1982;188(2):235-9.
37. Watkins JF, Sung P, Prakash L, Prakash S. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene *RAD23* encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7757-65.
38. Lommel L, Ortolan T, Chen L, Madura K, Sweder KS. Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome. *Curr Genet.* 2002 Oct;42(1):9-20.
39. Lambertson D, Chen L, Madura K. Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1999 Sep;153(1):69-79.
40. Saeki Y, Saitoh A, Toh-e A, Yokosawa H. Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 May 10;293(3):986-92.

41. Chen L, Madura K. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol*. 2002 Jul;22(13):4902-13.
42. Elsasser S, Chandler-Militello D, Muller B, Hanna J, Finley D. Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):26817-22.
43. Verma R, Oania R, Graumann J, Deshaies RJ. Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*. 2004 Jul 9;118(1):99-110.
44. Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*. 2002 Apr 18;416(6882):763-7.
45. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:1015-68.
46. Dahlmann B, Kopp F, Kuehn L, Nidel B, Pfeifer G, Hegerl R, Baumeister W. The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria. *FEBS Lett*. 1989 Jul 17;251(1-2):125-31.
47. Tamura T, Nagy I, Lupas A, Lottspeich F, Cejka Z, Schoofs G, Tanaka K, De Mot R, Baumeister W. The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol*. 1995 Jul 1;5(7):766-74.
48. Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J*. 2000 Feb 15;346 Pt 1:155-61.
49. Wendler P, Lehmann A, Janek K, Baumgart S, Enenkel C. The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin  $\alpha$  and proteasome functions. *J Biol Chem*. 2004 Sep 3;279(36):37751-62.
50. Nederlof PM, Wang HR, Baumeister W. Nuclear localization signals of human and *Thermoplasma* proteasomal  $\alpha$  subunits are functional in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):12060-4.
51. Hoyt MA, Coffino P. Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Jul;61(13):1596-600.
52. Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol*. 2005 Jan;15(1):27-33.
53. Glickman MH, Raveh D. Proteasome plasticity. *FEBS Lett*. 2005 Jun 13;579(15):3214-23.

54. Khor B, Bredemeyer AL, Huang CY, Turnbull IR, Evans R, Maggi LB Jr, White JM, Walker LM, Carnes K, Hess RA, Sleckman BP. Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol Cell Biol*. 2006 Apr;26(8):2999-3007.
55. Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Jan;74(1):54-8.
56. Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem*. 1986 Feb 15;261(5):2400-8.
57. Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem*. 1987 Jun 15;262(17):8303-13.
58. Waxman L, Fagan JM, Goldberg AL. Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*. 1987 Feb 25;262(6):2451-7.
59. Ganoth D, Leshinsky E, Eytan E, Hershko A. A multicomponent system that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Resolution of factors and evidence for ATP-dependent complex formation. *J Biol Chem*. 1988 Sep 5;263(25):12412-9.
60. Eytan E, Ganoth D, Armon T, Hershko A. ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(20):7751-5.
61. Armon T, Ganoth D, Hershko A. Assembly of the 26 S complex that degrades proteins ligated to ubiquitin is accompanied by the formation of ATPase activity. *J Biol Chem*. 1990 Dec 5;265(34):20723-6.
62. Driscoll J, Goldberg AL. The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J Biol Chem*. 1990 Mar 25;265(9):4789-92.
63. Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M. Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem*. 1992 Nov 5;267(31):22362-8.
64. Udvardy A. Purification and characterization of a multiprotein component of the *Drosophila* 26 S (1500 kDa) proteolytic complex. *J Biol Chem*. 1993 Apr 25;268(12):9055-62.
65. Chu-Ping M, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA, DeMartino GN. Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem*. 1994 Feb 4;269(5):3539-47.
66. Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*. 1994 Mar 11;269(10):7709-18.

67. Finley D, Tanaka K, Mann C, Feldmann H, Hochstrasser M, Vierstra R, Johnston S, Hampton R, Haber J, Mccusker J, Silver P, Frontali L, Thorsness P, Varshavsky A, Byers B, Madura K, Reed SI, Wolf D, Jentsch S, Sommer T, Baumeister W, Goldberg A, Fried V, Rubin DM, Toh-e A, et al. Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends Biochem Sci*. 1998 Jul;23(7):244-5.
68. Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. 1998 Sep 4;94(5):615-23.
69. Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV. Structural Organization of the 19S Proteasome Lid: Insights from MS of Intact Complexes. *PLoS Biol*. 2006 Aug 1;4(8)
70. Rubin DM, Glickman MH, Larsen CN, Dhruvakumar S, Finley D. Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J*. 1998 Sep 1;17(17):4909-19.
71. Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*. 2001 Jun;7(6):1143-52.
72. Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*. 1999 Aug;1(4):221-6.
73. Navon A, Goldberg AL. Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Mol Cell*. 2001 Dec;8(6):1339-49.
74. Swaffield JC, Bromberg JF, Johnston SA. Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature*. 1992 Jun 25;357(6380):698-700.
75. Russell SJ, Sathyanarayana UG, Johnston SA. Isolation and characterization of SUG2. A novel ATPase family component of the yeast 26 S proteasome. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):32810-7.
76. Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Goebel M, Taniguchi T, Matsumoto K. New human gene encoding a positive modulator of HIV Tat-mediated transactivation. *Nature*. 1992 Jun 25;357(6380):700-2.
77. Collins GA, Tansey WP. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Apr;16(2):197-202.
78. Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, Johnston SA. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 1999 Jun;3(6):687-95.

79. Ferdous A, Gonzalez F, Sun L, Kodadek T, Johnston SA. The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*. 2001 May;7(5):981-91.
80. Lee D, Ezhkova E, Li B, Pattenden SG, Tansey WP, Workman JL. The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell*. 2005 Nov 4;123(3):423-36.
81. Sikder D, Johnston SA, Kodadek T. Widespread, but non-identical, association of proteasomal 19s and 20s proteins with yeast chromatin. *J Biol Chem*. 2006 Jul 12
82. Morris MC, Kaiser P, Rudyak S, Baskerville C, Watson MH, Reed SI. Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature*. 2003 Jun 26;423(6943):1009-13.
83. Yanagi S, Shimbara N, Tamura T. Tissue and cell distribution of a mammalian proteasomal ATPase, MSS1, and its complex formation with the basal transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Dec 20;279(2):568-73.
84. Makino Y, Yoshida T, Yogosawa S, Tanaka K, Muramatsu M, Tamura TA. Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes Cells*. 1999 Sep;4(9):529-39.
85. Ghislain M, Udvardy A, Mann C. *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature*. 1993 Nov 25;366(6453):358-62.
86. Mamroud-Kidron E, Kahana C. The 26S proteasome degrades mouse and yeast ornithine decarboxylase in yeast cells. *FEBS Lett*. 1994 Dec 19;356(2-3):162-4.
87. Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Guldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kotter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*. 2002 Jul 25;418(6896):387-91.
88. Wojcik C, DeMartino GN. Analysis of *Drosophila* 26 S proteasome using RNA interference. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22;277(8):6188-97.

89. Mason GG, Murray RZ, Pappin D, Rivett AJ. Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome. *FEBS Lett.* 1998 Jul 3;430(3):269-74.
90. Takeuchi J, Toh-e A. Genetic evidence for interaction between components of the yeast 26S proteasome: combination of a mutation in RPN12 (a lid component gene) with mutations in *Rpt1* (an ATPase gene) causes synthetic lethality. *Mol Gen Genet.* 1999 Aug;262(1):145-53.
91. Takeuchi J, Tamura T. Recombinant ATPases of the yeast 26S proteasome activate protein degradation by the 20S proteasome. *FEBS Lett.* 2004 May 7;565(1-3):39-42.
92. Wang L, Mao X, Ju D, Xie Y. RPN4 is a physiological substrate of the Ubr2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 2004 Dec 31;279(53):55218-23.
93. Chuang SM, Chen L, Lambertson D, Anand M, Kinzy TG, Madura K. Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A. *Mol Cell Biol.* 2005 Jan;25(1):403-13.
94. Chuang SM, Madura K. *Saccharomyces cerevisiae* Ub-conjugating enzyme Ubc4 binds the proteasome in the presence of translationally damaged proteins. *Genetics.* 2005 Dec;171(4):1477-84.
95. van Nocker S, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, Fu H, Coux O, Wefes I, Finley D, Vierstra RD. The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol.* 1996 Nov;16(11):6020-8.
96. Babbitt SE, Kiss A, Deffenbaugh AE, Chang YH, Bailly E, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Buranda T, Sklar LA, Baumler J, Gogol E, Skowyra D. ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. *Cell.* 2005 May 20;121(4):553-65.
97. Kiss P, Szabo A, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradszky KF, Lipinszki Z, Pal M, Udvardy A. Zn<sup>2+</sup>-induced reversible dissociation of subunit Rpn10/p54 of the *Drosophila* 26 S proteasome. *Biochem J.* 2005 Oct 15;391(Pt 2):301-10.
98. Girod PA, Fu H, Zryd JP, Vierstra RD. Multiubiquitin chain binding subunit MCB1 (RPN10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell.* 1999 Aug;11(8):1457-72.
99. Smalle J, Kurepa J, Yang P, Emborg TJ, Babiychuk E, Kushnir S, Vierstra RD. The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell.* 2003 Apr;15(4):965-80.
100. Szlanka T, Haracska L, Kiss I, Deak P, Kurucz E, Ando I, Viragh E, Udvardy A. Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci.* 2003 Mar 15;116(Pt 6):1023-33.

101. Mannhaupt G, Schnall R, Karpov V, Vetter I, Feldmann H. RPN4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* 1999 Apr 30;450(1-2):27-34.
102. Xie Y, Varshavsky A. RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13;98(6):3056-61.
103. Ju D, Xie Y. Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):23851-4.
104. Lundgren J, Masson P, Mirzaei Z, Young P. Identification and characterization of a *Drosophila* proteasome regulatory network. *Mol Cell Biol.* 2005 Jun;25(11):4662-75.
105. Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.* 2004 Jan;2(1):E2.
106. Guterman A, Glickman MH. Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem.* 2004 Jan 16;279(3):1729-38.
107. Yao T, Cohen RE. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature.* 2002 Sep 26;419(6905):403-7.
108. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science.* 2002 Oct 18;298(5593):611-5.
109. Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science.* 2002 Oct 18;298(5593):608-11.
110. Lundgren J, Masson P, Realini CA, Young P. Use of RNA interference and complementation to study the function of the *Drosophila* and human 26S proteasome subunit S13. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(15):5320-30.
111. Holzl H, Kapelari B, Kellermann J, Seemuller E, Sumegi M, Udvardy A, Medalia O, Sperling J, Muller SA, Engel A, Baumeister W. The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *J Cell Biol.* 2000 Jul 10;150(1):119-30.
112. Pankotai T, Komonyi O, Bodai L, Ujfaludi Z, Muratoglu S, Ciurciu A, Tora L, Szabad J, Boros I. The homologous *Drosophila* transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions. *Mol Cell Biol.* 2005 Sep;25(18):8215-27.

113. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem.* 1999 May 15;270(1):41-9.
114. Fehon RG, Dawson IA, Artavanis-Tsakonas S. A *Drosophila* homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development.* 1994 Mar;120(3):545-57.
115. Thummel, C. S., and Pirrotta, V. Technical notes: new pCasper P-element vectors. *Drosoph. Inf. Serv.* 1992; 71, 150-154.
116. Spradling, A.C. (1986) in *Drosophila, a Practical Approach*, (Roberts, D. B., eds) pp. 175–198, IRL Press, Oxford.)
117. Pile LA, Wassarman DA. Localizing transcription factors on chromatin by immunofluorescence. *Methods.* 2002 Jan;26(1):3-9.
118. Deak P, Donaldson M, Glover DM. Mutations in makos, a *Drosophila* gene encoding the Cdc27 subunit of the anaphase promoting complex, enhance centrosomal defects in polo and are suppressed by mutations in twins/aar, which encodes a regulatory subunit of PP2A. *J Cell Sci.* 2003 Oct 15;116(Pt 20):4147-58.
119. Kadonaga JT. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp Mol Med.* 2002 Sep 30;34(4):259-64.
120. Elsasser S, Schmidt M, Finley D. Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 2005;398:353-63.
121. Fraser RA, Rossignol M, Heard DJ, Egly JM, Chambon P. SUG1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14;272(11):7122-6.
122. Chen Y, Sharp ZD, Lee WH. HEC binds to the seventh regulatory subunit of the 26 S proteasome and modulates the proteolysis of mitotic cyclins. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19;272(38):24081-7.
123. Takeuchi J, Fujimuro M, Yokosawa H, Tanaka K, Toh-e A. Rpn9 is required for efficient assembly of the yeast 26S proteasome. *Mol Cell Biol.* 1999 Oct;19(10):6575-84.
124. Bailly E, Reed SI. Functional characterization of rpn3 uncovers a distinct 19S proteasomal subunit requirement for ubiquitin-dependent proteolysis of cell cycle regulatory proteins in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 1999 Oct;19(10):6872-90.
125. McDonald HB, Helfant AH, Mahony EM, Khosla SK, Goetsch L. Mutational analysis reveals a role for the C terminus of the proteasome subunit Rpt4p in spindle pole body duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2002 Oct;162(2):705-20.



126. Lier S, Paululat A. The proteasome regulatory particle subunit Rpn6 is required for *Drosophila* development and interacts physically with signalosome subunit Alien/CSN2. *Gene*. 2002 Oct 2;298(2):109-19.
127. Yen HC, Espiritu C, Chang EC. Rpn5 is a conserved proteasome subunit and required for proper proteasome localization and assembly. *J Biol Chem*. 2003 Aug 15;278(33):30669-76.
128. Sone T, Saeki Y, Toh-e A, Yokosawa H. Sem1p is a novel subunit of the 26 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):28807-16.
129. Funakoshi M, Li X, Velichutina I, Hochstrasser M, Kobayashi H. Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *J Cell Sci*. 2004 Dec 15;117(Pt 26):6447-54.
130. Isono E, Saito N, Kamata N, Saeki Y, Toh-E A. Functional analysis of Rpn6p, a lid component of the 26 S proteasome, using temperature-sensitive rpn6 mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):6537-47.
131. Li Z, Wang CC. Functional characterization of the 11 non-ATPase subunit proteins in the trypanosome 19 S proteasomal regulatory complex. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):42686-93.
132. Takahashi M, Iwasaki H, Inoue H, Takahashi K. Reverse genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome subunits by RNA interference. *Biol Chem*. 2002 Jul-Aug;383(7-8):1263-6.
133. Zwickl P, Ng D, Woo KM, Klenk HP, Goldberg AL. An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes. *J Biol Chem*. 1999 Sep 10;274(37):26008-14.
134. Benaroudj N, Goldberg AL. PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nat Cell Biol*. 2000 Nov;2(11):833-9.
135. Benaroudj N, Zwickl P, Seemuller E, Baumeister W, Goldberg AL. ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation. *Mol Cell*. 2003 Jan;11(1):69-78.
136. Smith DM, Kafri G, Cheng Y, Ng D, Walz T, Goldberg AL. ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol Cell*. 2005 Dec 9;20(5):687-98.
137. Kominami K, DeMartino GN, Moomaw CR, Slaughter CA, Shimbara N, Fujimuro M, Yokosawa H, Hisamatsu H, Tanahashi N, Shimizu Y, et al. Nin1p, a regulatory subunit of the 26S proteasome, is necessary for activation of Cdc28p kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1995 Jul 3;14(13):3105-15.

138. Saville KJ, Belote JM. Identification of an essential gene, *l(3)73Ai*, with a dominant temperature-sensitive lethal allele, encoding a *Drosophila* proteasome subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 1;90(19):8842-6.
139. Smyth KA, Belote JM. The dominant temperature-sensitive lethal DTS7 of *Drosophila melanogaster* encodes an altered 20S proteasome beta-type subunit. *Genetics*. 1999 Jan;151(1):211-20.
140. Neuburger PJ, Saville KJ, Zeng J, Smyth KA, Belote JM. A genetic suppressor of two dominant temperature-sensitive lethal proteasome mutants of *Drosophila melanogaster* is itself a mutated proteasome subunit gene. *Genetics*. 2006 Jul;173(3):1377-87.
141. Ziemba H, Bialy LP, Fracki S, Bablok L, Wojcik C. Proteasome localization and ultrastructure of spermatozoa from patients with varicocele--immunoelectron microscopic study. *Folia Histochem Cytobiol*. 2002;40(2):169-70.
142. Heessen S, Masucci MG, Dantuma NP. The UBA2 domain functions as an intrinsic stabilization signal that protects Rad23 from proteasomal degradation. *Mol Cell*. 2005 Apr 15;18(2):225-35.
143. Satoh K, Sasajima H, Nyomura KI, Yokosawa H, Sawada H. Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry*. 2001 Jan 16;40(2):314-9.
144. Thornton BR, Ng TM, Matyskiela ME, Carroll CW, Morgan DO, Toczyski DP. An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*. 2006 Feb 15;20(4):449-60.
145. Jorgensen JP, Lauridsen AM, Kristensen P, Dissing K, Johnsen AH, Hendil KB, Hartmann-Petersen R. Adrm1, a putative cell adhesion regulating protein, is a novel proteasome-associated factor. *J Mol Biol*. 2006 Jul 28;360(5):1043-52.
146. Verma R, Chen S, Feldman R, Schieltz D, Yates J, Dohmen J, Deshaies RJ. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell*. 2000 Oct;11(10):3425-39.
147. Halawani D, Latterich M. p97: The cell's molecular purgatory? *Mol Cell*. 2006 Jun 23;22(6):713-7.
148. Hanna J, Hathaway NA, Tone Y, Crosas B, Elsasser S, Kirkpatrick DS, Leggett DS, Gygi SP, King RW, Finley D. Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell*. 2006 Oct 6;127(1):99-111.
149. Crosas B, Hanna J, Kirkpatrick DS, Zhang DP, Tone Y, Hathaway NA, Buecker C, Leggett DS, Schmidt M, King RW, Gygi SP, Finley D. Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell*. 2006 Dec 29;127(7):1401-13.

150. Heitzler P, Coulson D, Saenz-Robles MT, Ashburner M, Roote J, Simpson P, Gubb D. Genetic and cytogenetic analysis of the 43A-E region containing the segment polarity gene *costa* and the cellular polarity genes *prickle* and *spiny-legs* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1993 Sep;135(1):105-15.
151. Nagengast AA, Salz HK. The *Drosophila* U2 snRNP protein U2A' has an essential function that is SNF/U2B' independent. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(18):3841--3847.
152. Mason GG, Hendil KB, Rivett AJ. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity. *Eur J Biochem*. 1996 Jun 1;238(2):453-62.
153. Marais G, Nouvellet P, Keightley PD, Charlesworth B. Intron size and exon evolution in *Drosophila*. *Genetics*. 2005 May;170(1):481-5.
154. Rorth P. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12418-22.

## Összefoglaló

Az eukarióta szervezetek sejt szintű homeosztázisának fenntartásához számtalan szabályozó folyamat finoman irányított koordinációja szükséges. Az egyik, leginkább az utóbbi másfél évtizedben megismert nagy fontosságú szabályozás ezekben az élőlényekben a 26S proteasómán keresztül valósul meg. Ez a 2 MDa-nál nagyobb tömegű, sok alegységből felépülő, szabályozott aktivitású proteáz képes lebontani a multiubiquitinált fehérjéket. A szubsztrátfehérjékhez kovalensen kapcsolt multiubiquitin lánc létrejötte három enzim működésének köszönhető, amelyek sejtben előforduló típusait összefoglalva ubiquitin ligáz rendszernek nevezik. Az ubiquitinált fehérjék szállítását és proteasóma általi felismerését proteasómális és a komplexhez csupán lazán kapcsolódó fehérjék egyaránt végezhetik. A 26S proteasóma két nagy komponensből, a 19S vagy regulátor és 20S vagy katalitikus komplexből épül fel. Egy, a proteolízis végrehajtásáért felelős katalitikus komplexhez egy vagy két, a proteolízis szabályozott lefolytatását és a multiubiquitinált fehérjék felismerését és processzálását végző regulátor komplex csatlakozik annak egyik vagy mindkét végén. A regulátor komplexek szerkezetileg és feltehetőleg funkcionálisan is két részre, az alap és fedő alkomplexekre tagolódnak. Az alap alkomplex közvetlenül kapcsolódik a 20S partikulumhoz, annak külső gyűrűjéhez, míg a fedő alkomplex az alapra épülve, a 20S komplextől távolabb helyezkedik el. Az alap alkomplex háromféle fő funkcionális csoportba tartozó fehérjékből épül fel. A p54/Rpn10/S5a fehérje a regulátor komplex fő multiubiquitin receptora. A p110 és p97 alegységek a regulátor komplex strukturális bázisát képezik, sok fehérje-fehérje kapcsolatot létesítenek a komplexen belül, valamint a proteasómához lazán asszociált fehérjékkel. Végül az alap alkomplexhez tartozik hat darab ATPáz alegység, amelyek gyűrű alakban egymáshoz és a 20S komplexhez kapcsolódnak. Ezeknek az AAA családba tartozó ATPázoknak mindegyike egyéni funkcióval rendelkezik a sarjadzó élesztőben, tehát nem redundánsak. Vizsgálatuk azonban csupán a kezdeti fázisban van még az élesztőben is, míg a magasabbrendű eukariótákban nagyon kevés információ áll rendelkezésre ezekről az alegységekről. Kutatásaim tárgya a *Drosophila melanogaster* egyik proteasómális ATPázának, a p48B/Rpt1/S7-nek a proteasómában és a sejtben lezajló folyamatokban betöltött szerepe.

Az *Rpt1* alegység génjében négy, P-elem okozta független mutáció is ismert, amelyek nyilvánosan hozzáférhetők. Vizsgálatukkal kezdtem neki a génfunkció felderítésének. A P-elemek mindegyike a gén 5'-nem transzlált régiójában foglal helyet. Három második lárvastádiumú (L2) és egy bábletális recesszív P-elem állt, valamint egy EMS indukált mutánst azonosítottunk, amely nem komplementálta P-elem allélokát. Az EMS mutáns második lárvastádiumú letalitást mutatott. Transzpozázforráshoz keresztezéssel kiugrattuk az egyik, második lárvastádiumú letalitást okozó P-elemet, hogy a gén funkcióját deléciós mutánsok útján vizsgálhassuk. A kiugratásból bábletális és L2 letális törzseket kaptunk, amelyekben a letalítás 1-35 bp, illetve 250-1000 bázispárnyi P-elem vég visszamaradás következménye volt. A mutációk az eredeti P-elem pozíciójában maradtak. Ezeket a mutánsokat, valamint az eredeti P-elem allélokát és az EMS mutánst alapos genetikai ellenőrzésnek vetettük alá. Két, az *Rpt1* régióját kitakaró, átfedő delécióval szemben a mutánsok megőrizték letálfázisukat. Kivétel volt ez alól az EMS mutáns, amely transzheterozigótaként bábletalitást mutatott. Ez az allél az *Rpt1* fehérje 382. aminosavát változtatja glicinről aszparaginsavra egy pontmutáció révén. Letálfázisát befolyásolja egy szemiletális háttérmutáció. Egy homozigóta bábletális mutánst (*Rpt1<sup>Pl</sup>*) sikerült egy, a vad *Rpt1* gént tartalmazó transzgénnel menekíteni. A *CG17985* gén, amelynek intronjában az *Rpt1* helyet foglal, megőrizte expressziójának mértékét a *Rpt1<sup>Pl</sup>* bábletális mutánsban. Mindezek az eredmények meggyőztek arról, hogy *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáció, amely a letalitást eredményezi, csupán az *Rpt1*-et érinti. Az L2 letális inszerciók menekítési kísérlete, amely bábstádiumú letalitást eredményezett, azt sugallja, hogy az összes P-elem inszerció nemcsak az *Rpt1*-ben, hanem a *CG17985*-ben is letális mutációt okoz.

Három P-elem, illetve az excízióból származó inszerciók a gén egyik promoter elemében ülnek, amely a P-elem integrációjakor megduplázódott és a gén kódoló régió felé eső szakaszán megismétlődik. Így a P-elem és annak maradékai eltávolítják egymástól a promoter két elemét (Inr és DPE), ezáltal a génen a transzkripció hatékonyság csökken. Ennek bizonyítására a génterméket reverz transzkripcióval kapcsolt kvantitatív real-time PCR-rel amplifikáltuk és az egyik bábletális mutánsban (*Rpt1<sup>Pl</sup>*) harmincszoros csökkenést tapasztaltunk az *Rpt1* transzkript mennyiségében a vad mintához képest. Különbséget találtunk az *Rpt1* fehérje szintjében is a mutáns és vad bábok között immunoblotos technikával. Az egyik, már a real-time PCR-ben is felhasznált bábletális mutánst (*Rpt1<sup>Pl</sup>*) részletesebb vizsgálatnak vetettük alá.

Kiderült, hogy nem csak az Rpt1, de több más proteaszóma alegység expressziója is megváltozik a mutánsban. Natív gélelektroforézissel elválasztva a proteaszóma formákat kiderült, hogy a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsban eltűnik a két 26S proteaszóma forma, egy köztes mobilitású komplex keletkezik, amely kevésbé abundáns. A szabad 20S katalitikus komplex mennyisége drasztikusan megnő, és jelentkezik egy, a vadban nem megfigyelhető, gyorsan vándorló, regulátor komplex alegységeket tartalmazó komplex. Ezek a jelek arra utalnak, hogy a mutáns bábokban a 26S proteaszóma szerkezete megbomlik, összeszerelődésében a regulátor komplex károsodása következtében súlyos zavarok lépnek fel. Ezzel összhangban a multiubiquitinált fehérjék felszaporodnak a mutánsban, noha összehasonlítva egy multiubiquitin receptor nullmutánsban talált különbséggel, ez a változás kisebb mértékű. A ciklinA és B proteaszóma szubsztrátok nem vagy csak kissé szaporodnak fel a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutánsban. Nagyon érdekes módon a Rad23 fehérje egyik izoformájánál is megfigyeltünk fehérjemennyiségbeli növekedést. A Rad23 a legfontosabb multiubiquitin receptorok egyike, lazán kapcsolódik csupán a proteaszómához. A *Drosophila* Rad23 génje két nagyon hasonló mRNS-t kódol, melyekről egy teljes hosszúságú (A) és egy N-terminálison csonkolt (B) fehérje keletkezik. A B formának hiányzik a teljes UBL (ubiquitin-like) doménje, amely a proteaszómához kapcsolódásban játszik szerepet. Ez a Rad23B fehérje az, amely felszaporodik a mutánsban, míg a Rad23A mennyisége nem változik. Ez a különbség nem magyarázható a *Rad23B* mRNS koncentrációjának növekedésével, mivel a vad és *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns bábok *Rad23B* mRNS tartalma megegyező real-time PCR-rel mérve. Ez arra enged következtetni, hogy a proteaszóma normál esetben képes a Rad23B-t bontani. Nyálmirigy óriáskromoszómán vizsgálva az Rpt1 jelenlétét felfedeztük, hogy az alegység specifikusan festődik a kromatinon, tehát szerepe lehet a transzkripcióban vagy a DNS javításban, ahogy már az utóbbi időben ezt kimutatták. A mutánsban ez a festődés vagy eltűnik vagy nagyon lecsökken. A vad kromoszómán az Rpt1 részben puffokhoz lokalizált és több helyen együtt fordul elő az RNS polimeráz II-vel. Szinergisztikus genetikai interakciót sikerült kimutatni a *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns és a *ΔRpn10/S5a/p54* és *mks<sup>1</sup>* mutánsok között. A *mks<sup>1</sup>* az APC/C Cdc27 alegységének hipomorf mutációja. A *Rpt1<sup>Pl</sup>* mutáns lárvák neuroblaszt preparátuma nem mutatott mitotikus defektusokat, amelyek a *ΔRpn10/S5a/p54* mutáció esetén megfigyelhető voltak. Két dimenziós gélelektroforézissel és burgonya savas foszfatáz kezeléssel

sikerült belátni, hogy az Rpt1 legalább öt, különbözőképpen foszforilált formában van jelen a vad és *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns bábokban. A legabundánsabb forma mennyisége lecsökkent a *Rpt1<sup>P1</sup>* mutánsban, míg a többiek mennyisége összevethető maradt a vad típussal.

Az *Rpt1* mutánsainak azonosítása és a velük való munka sok érdekes eredményt hozott a *Drosophila melanogaster*-t, mint olyan magasabbrendű eukariótát felhasználva, ahol ezt az alegységet genetikailag még nem vizsgálták. A *Rpt1<sup>P1</sup>* mutáns Rad23B-re gyakorolt hatása előrevetíti ennek a Rad23 formának a proteaszóma általi szabályozását, feltehetőleg a fehérje lebontása révén. Az Rpt1 és más proteaszómális ATPázok szerepét a transzkripcióban még kevés alkalommal vizsgálták kromoszómafestéssel. Az ezzel a módszerrel kapott eredmények segíthetnek a proteaszóma célfehérjéinek megtalálásában és az egyes komplexek transzkripciós szerepének tisztázásában. Az Rpt1 multifoszforilációjának felfedezése fontos proteaszóma szabályozási formára deríthet fényt. Ezek az eredmények tehát megmutatták, hogy a *Drosophila* genetika értékes eszköze lehet a proteaszóma kutatásának.

## Summary

The eukaryotic 26S proteasome defines the final fate of many proteins by recognizing the multiubiquitin tag attached to the appropriate protein and thereafter executing its destruction through deubiquitylation, unfolding and translocation to the peptidase sites. Lastly, cleavage of the protein backbone occurs after every 8-10 amino acids. The integrity of this huge multiprotein complex is ATP-dependent. Within the proteasome, the activity of the core protease particle is regulated by one or two regulatory complexes (RC). The RC-s are responsible for the substrate recognition, deubiquitylation, unfolding and feeding into the 20S proteasome. The RCs' interaction with multiubiquitylated proteins is dependent upon both transiently associated and stably incorporated ubiquitin receptors. The RC is comprised of two well-defined protein complexes, the lid and the base. The base is attached to the 20S core particle, while the lid is situated distally to the 20S. The base contains six AAA-type ATPases, similar to each other in sequence, which are assumed to function as reverse chaperones, unfolding the substrate and translocating it through the opened orifice of the core peptidase right to the protease sites. Despite their sequence similarities, several unique features were discovered concerning these ATPases, even though their direct functional pathways and their interactions with other proteins are mostly unknown. All proteasomal ATPases are indispensable in *Saccharomyces cerevisiae*.

One of these proteins, p48B/Rpt1/S7 is mostly uncharacterized in *Drosophila*. The ease of mutagenesis with P-elements and subsequent detection of mutations in this organism helped us to characterize four P-element insertions in the 5'-untranslated region (UTR) of the *Rpt1* gene. These insertions proved to be homozygous recessive lethals, three mutants dying in second larval stage (L2) and one in pupal stage. We also found an EMS induced *Rpt1* mutant that did not complement the P-element insertions. This mutant was recessive L2 lethal, but it was recessive pupal lethal over a deletion spanning the *Rpt1* region. One larval lethal P-element allele was modified by transposase-induced P-element excision in order to produce small deletions and the resulting white-eyed flies were further examined. These mutants could be sorted into two lethality groups, such as second larval stage and pupal stage lethals. After sequencing their appropriate genomic regions, pupal



lethality was found to be associated with short (1-35 bp) while the larval lethality with long (more than 250 bp) residual P-element sequences at the original insertion site. Several tests were performed in order to verify the relationship between the mutation in the gene and the lethality stage, considering the possibility that a second-site mutation could be responsible for the phenotype. The mutants preserved their phenotype above two overlapping deletions uncovering the *Rpt1* region, except the EMS mutant which showed pupal lethality. The EMS mutant carries a point mutation at the 382nd position of the Rpt1 protein and suffers from a background semilethal mutation. The point mutation changes glycine to aspartic acid.

The *Rpt1* gene in *Drosophila* is a nested gene located inside the second intron of the annotated, but uncharacterized *CG17985* gene. Transgenic rescue experiments and RT-PCR-s revealed that the damage of *CG17985* cannot be responsible for the phenotype of the *Rpt1<sup>P1</sup>* pupal lethal *Rpt1* mutant. In the L2 lethal P-element mutants, however, the phenotype is affected by the mutation of both the *Rpt1* and *CG17985* genes. Subsequently, the effect of the *Rpt1<sup>P1</sup>* mutation on the subunit expression and modification was investigated and we discovered profound changes both at mRNA and protein levels in case of the *Rpt1* mutant compared to the wild-type. RT-PCR and real-time quantitative PCR analysis revealed a 30-fold decrease in full-length *Rpt1* mRNA expression in the *Rpt1<sup>P1</sup>* mutant. Immunoblot analysis confirmed these results since the blot showed reduced Rpt1 protein concentration in the mutant. Promoter analysis of the *Rpt1* sequence revealed that two essential promoter sequences, Inr and DPE were displaced in the excision mutants explaining the drop at *Rpt1* mRNA and protein concentrations. At molecular levels we found several ubiquitin-proteasome system-related abnormalities in the mutant animals. Native gel electrophoresis demonstrated that the two forms of 26S proteasome disappeared, and the amount of free 20S proteasome increased in the *Rpt1<sup>P1</sup>* mutant. The accumulation of ubiquitylated proteins is also characteristic of the mutants. Nevertheless, typical proteasome substrates, such as cyclinA and B hardly accumulate in the mutant. We found that Rad23B, which is a nucleotide excision repair factor and, in addition, a shuttling multiubiquitin receptor is also affected: in *Rpt1<sup>P1</sup>* mutants accumulation of the Rad23B protein is observed compared to the wild-type. Since *Rad23B* mRNA level is constant in the mutant in comparison with the wild-type, we conclude that Rad23B protein is subjected to proteasomal degradation under normal circumstances. The expression of some proteasome subunits other than Rpt1 seems to be only

slightly elevated. Immunostaining of larval polytene chromosome spreads showed association of Rpt1 with bands and puffs on the chromosome of wild-type larvae, and colocalization with RNA polymerase II was also observed. Chromosomes prepared from *Rpt1<sup>P1</sup>* mutant larvae showed faint, unspecific anti-Rpt1 staining. The *Rpt1<sup>P1</sup>* mutant did not show any mitotic abnormalities. Synergistic genetic interaction was found between *Rpt1<sup>P1</sup>-ΔRpn10/S5a/p54* and *Rpt1<sup>P1</sup>-mks<sup>1</sup>* mutants, respectively. Two-dimensional gel electrophoresis and phosphatase treatment revealed 5 phosphorylated forms of Rpt1. The relative ratios of phosphorylated and unphosphorylated Rpt1 proteins were altered in the *Rpt1<sup>P1</sup>* mutant.

To sum up the previous findings we analyzed several mutant alleles of one proteasomal ATPase gene. Our results showed that this subunit is essential in *Drosophila* development and provided us with interesting insights into the function and regulation of the proteasome regulatory complex, especially its modification by phosphorylation, its role in transcription and its relation to ubiquitin receptors. This work also underpins the importance of proteasome genetics in multicellular eukaryotes, such as *Drosophila*.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel és mélységes hálával tartozom az összes itt felsorolt embernek, aki ebben a munkában ilyen vagy olyan módon, de lelkesen és komoly kétségek nélkül részt vett és számomra lehetővé tette, hogy doktori értekezés formájába öntsem közös kutatási eredményeinket. Nélkülük a munka el sem kezdődhetett és be sem fejeződhetett volna.

Köszönöm Dr. Udvardy Andornak, témavezetőmnek azon készségeim kifejlesztését, amelyek a munkához elengedhetetlennek bizonyultak; a téma szerencsés kiválasztását, amellyel viszonylag könnyen és gyorsan sikereket érhettem el; a folyamatos szakmai irányítást és ellenőrzést, amellyel a gén jellemzése előrehaladt; a natív gélelektroforézis és az ehhez kapcsolódó kísérletek megtanítását és elvégzését; és végül a szakadatlan támogatást és hitet, amely nélkül nem pályázhatnék a Ph.D. címre.

Köszönöm Deákné Pál Margitnak (Margónak), hogy a minden kísérlet előzményét és alapját adó muslincagenetikát és a legyek gondozását hihetlen türelemmel, szeretettel és jóindulattal adta át nekem, szünet nélkül segítve, ha úgy kellett. Az első sikerek az ő keze nyomát is hordozzák. Tanácsaival az utolsó percig nagy segítségemre volt és az Rpt1-ről szóló cikk háttérében álló fizikai munka knowhow-ja mind az ő felfogásának párlata. Éleslátása sok kudarcra ítélt kísérlettől kímélt meg. Az összes *Drosophila* munka, amely a tézisben olvasható, jórészt az ő elgondolásán és az én fizikai munkámon alapul. Ezenkívül ő hozta létre az egy kromoszómára rekombinált  $\Delta Rpn10/S5a/p54$  mutációt és kereste a mitotikus fenotípust.

Köszönöm Kiss Petrának, munkatársamnak és jóbarátomnak, hogy tartotta bennem a lelket a nehéz, sikertelen időszakokban is; hogy meglepő megjegyzéseivel sikerült számos kísérlet értelmezését egészen új irányba terelnie; hogy gondozta a legyeket, hogyha szükség volt rá és láthatólag ez nem esett nehezebbre; és végül, hogy a legtöbb két dimenziós gélelektroforézis kísérlet elvégzésével az egyik legfontosabb és leginkább sokat sejtető eredményt sikerült produkálnia az Rpt1 projektben, mindezt hanyag eleganciával.

Köszönöm Dr. Deák Péternek, hogy bevezetett a légygenetika elméletébe és számos keresztezést tervezett velem. Hasznos tanácsai végigkísérték a projekt alakulását. A genetikus szemével tudta felmérni azokat a nehézségeket, amikhez nekünk nem volt még meg a kellő tapasztalatunk. A kiugratás és a mutánsokat ellenőrző kísérletek mind az ő elgondolásaiból születtek és segítettek a remélhetőleg szigorú tudományos mércékkel is megbízhatónak bizonyult mutánsjellemzés létrejöttében. Gondolatai sokszor mozdítottak előre minket a holtpontról. A *mások* mutánsokat is ő bocsátotta rendelkezésünkre.

Köszönöm Lipinszki Zoltánnak, laborunk új Ph.D. hallgatójának a szüntelen jókedvet, amivel minket is örvendeztetett; a Rad23 elleni ellenanyagot, amely az őáltala készített tisztított fehérje ellen készült; kérdéseit a témámmal kapcsolatban, amivel fontosságát sikerült velem elhíttetnie; és a sok programot, amelyet a számítógépre pakolva megkímélt engem azok megkeresésétől és telepítésétől, többek között ezt a disszertációt is jelentősen előbbremozdítva ezzel.

Köszönöm Pankotai Tibornak, hogy nem csak barátságával, de szerteágazó tudásának morzsáival is megajándékozott és Dr. Komonyi Orbánnal együtt kitalálták a nyálmirigy óriáskromoszómafestés hasznosságát a proteaszóma vizsgálatában. Dacolva a rázúduló más munkákkal, a kezdeti kromoszómafestéseket (és az utolsókat is) mind ő végezte, nekem csak kiegészítő szerep jutott ebben a projektben. A kromoszómafestéssel kapcsolatos ábrák mind az ő munkái.

Dr. Komonyi Orbánnak köszönöm türelmét és segítségét a festések kitalálásában és létrejöttében.

Újfaludi Zsuzsannának hálával tartozom azért, mert fáradságot és időt nem kímélve megismertetett a real-time PCR elméletével és gyakorlatával. Az Rpt1 mérését velem közösen, a Rad23B-ét pedig ő maga végezte, cseppet sem panaszkodva a felmerülő nehézségek miatt. Optimizmusa igen jó hatással volt a munka haladására, ami igencsak örömmel töltött és tölt el most is.

Dr. Boros Imrének köszönöm azt, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a real-time PCR készüléket és hozzá két embert, Tibit és Zsuzsit az ő csoportjából engedett az Rpt1 projektben részt venni.

Dr. Gyurkovics Henriknek köszönöm sokatmondó megjegyzéseit, amelyekkel a kromoszómafestések értelmezésében segítségünkre volt. Mérhetetlen tapasztalata teljesen új értelmezést adott az Rpt1 és az RNS polimeráz II lokalizációjának.

Köszönöm Dr. Udvardy Katalinnak, hogy rendkívül segítőkészen, mindig a maximumra törekedve segítette munkánk előrehaladását és bármilyen szituációban azonnal lehetett hozzájárulására számítani.

Nótári Péternének (Icának) köszönöm technikai segítségét és számos történetét, amely mindig kapcsolódott valahogy a folyó munkákhoz és néha jelentős megkönnyebbülést okozott nekem.

Köszönöm Nagy Olgának az együtt töltött órákat (napokat? éveket?) a légyszobában, mikor is számos törzs cserélt gazdát és valahogy sosem halt ki semmi, ami kihalófélben volt. Tanácsai mindig is elkeltek nekünk, gyakorlatlan genetikusoknak.

Köszönöm Dr. Sümegi Máténak, laborunk egykori tagjának, hogy a nevelésünkben tevékeny részt vállalt és tudománnyal kapcsolatos nézeteit nem átalotta vitára bocsátani és szembesíteni velünk. Intelligenciája sokszor húzott ki a bajból a kezdeti időkben, majd később is. Az, hogy Ph.D. címre pályázok, részben neki is köszönhető.

Végezetül köszönöm feleségemnek, Dr. Krecsmarik Mónikának, hogy mindent megtett, ami emberileg tehető azért, hogy én jól érezzem magam és újult erővel menjek küzdeni a laborba. Önfeláldozása jelentős időt hagyott nekem munkám elvégzésére és tanácsai, elképzelései nagy mértékben befolyásolták viszonyomat a munkámhoz és feltételezéseim szerint kissé racionalizálták is azt. Kérdései, melyet neurobiológusként az én szakterületemmel kapcsolatban feltett, néha elemi erővel világítottak rá dolgokra, melyeket korábban nem értettem. Kétségeimet igyekezett lecsitítani, de terveimben mindig támogatott, megfelelő közös mérlegelés után. További karrierem sorsa fele részben az ő kezében van. Családi boldogságom az eredete minden itt leírt sikeres kísérletnek.

## Közlemények

1. Kiss P., **Szabó Á.**, Hunyadi-Gulyás É., Medzihradszky K.F., Lipinszki Z., Pál M., Udvardy A. (2005) *Zn<sup>2+</sup>-induced reversible dissociation of subunit Rpn10/p54 of the Drosophila 26S proteasome*. Biochemical Journal; 391(Pt 2):301-10. IF: 4,224
  
2. **Szabó Á.**, Pál M., Deák P., Kiss P., Újfaludi Zs., Pankotai T., Lipinszki Z. and Udvardy A. (2007) *Molecular characterization of the Rpt1/p48B ATPase subunit of the Drosophila melanogaster 26S proteasome*. Molecular Genetics and Genomics (közlés alatt) IF:2,632